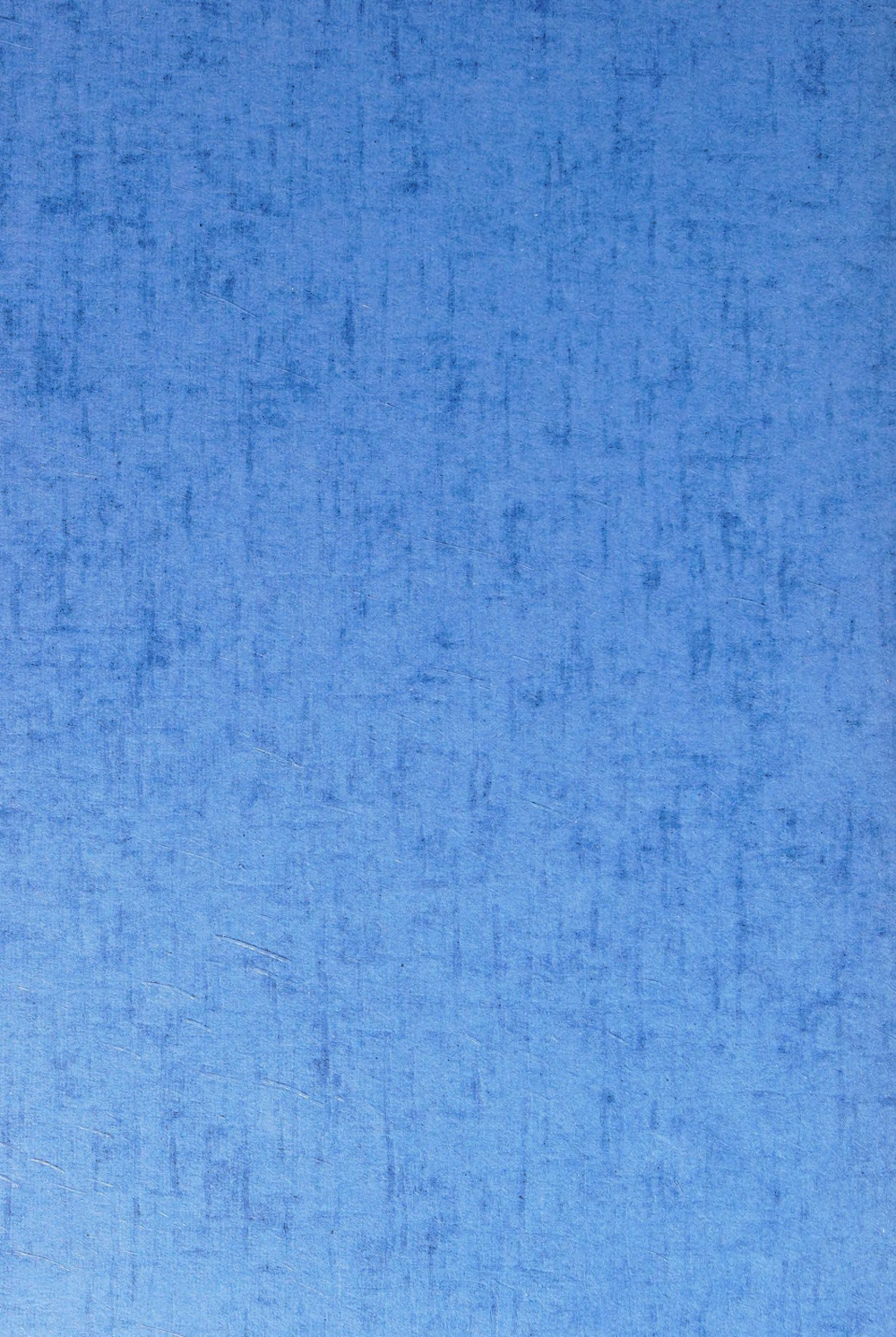


**ZUR METHODIK DER MESSUNG DES
KOLLOIDOSMOTISCHEN DRUCKES
BIOLOGISCHER FLÜSSIGKEITEN**

Rudolf Schröck

1974



Aus der Herzchirurgischen Abteilung an der
Chirurgischen Klinik der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. med. W. Kliner)

ZUR METHODIK DER MESSUNG DES
KOLLOIDOSMOTISCHEN DRUCKES
BIOLOGISCHER FLÜSSIGKEITEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rudolf Schröck
aus
München

1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. F. Sebening

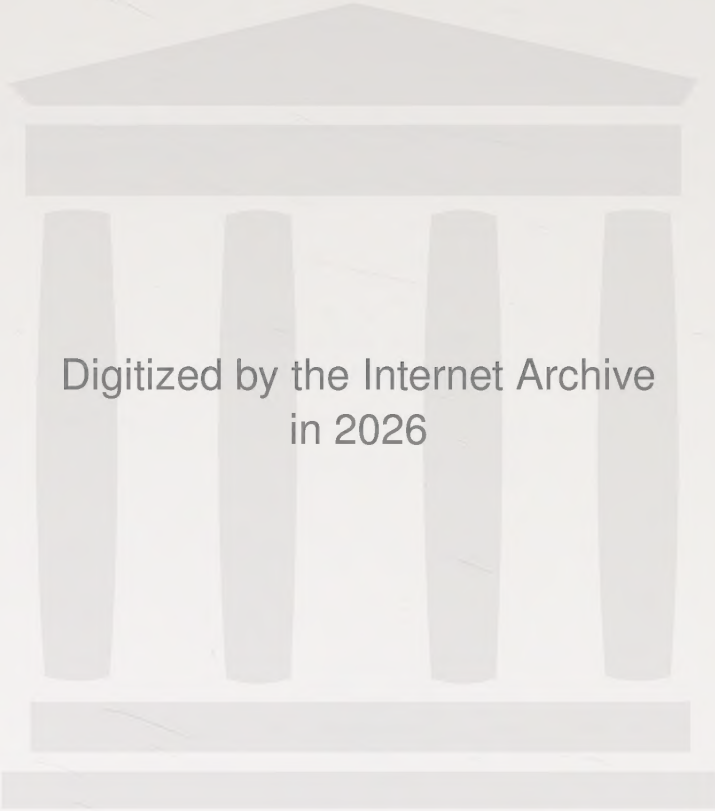
Mitberichterstatter: Prof. Dr.med. W. Kliner

Dekan: Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 1974



Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0075

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. PHYSIKALISCHE CHEMIE UND PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DES KOLLOIDOSMOTISCHEN DRUCKES (KOD)	2
I. Der osmotische Druck makromolekularer Lösungen	2
1. Van't Hoff'sches Gesetz	2
2. Thermodynamische Betrachtungsweise	3
3. Der KOD von Proteinlösungen	4
4. Terminologie makromolekularer Lösungen	7
II. Die physiologische Bedeutung des KOD	9
1. Die Endstrombahn und ihre Parameter	9
2. Die Bedeutung des KOD für den Gesamt- organismus	16
C. METHODIK	18
I. Meßmethoden zur Bestimmung des KOD von Proteinlösungen	18
1. Statische Methode	18
2. Dynamische Methoden	19
3. Modifikationen	20
4. Methode nach A. T. Hansen	20
II. Eigene Modifikation der Meßmethode nach A. T. Hansen	24
1. Meßanordnung	24
2. Meßvorbereitung	28
3. Meßvorgang	29
4. Meßgenauigkeit	30

	Seite
III. Das Problem der Membran	31
1. Die ideale Membran	31
2. Gebräuchliche Membranen	31
IV. Membran und osmotische Messung	37
1. Monodisperses System	37
2. Polydisperses System	37
D. ERGEBNISSE	40
I. Membranuntersuchungen	40
1. Membranmaterial	40
2. Mechanische Eigenschaften	41
3. Hydraulische Leitfähigkeit	41
4. Selektivität	45
II. Der zeitliche Verlauf der osmotischen Messung	48
1. Allgemeine Kriterien	48
2. Einstellungsvorgang bei polydispersen Systemen	49
III. Physikalisch-chemische Untersuchungen	53
1. Korrelation von Konzentration und KOD bei Kolloidlösungen	53
2. Osmometrische Molekulargewichtsbe- stimmungen	57
3. Verhalten von Gelen und Gel-Protein- lösungen	60
IV. Physiologische Untersuchungen: KOD bei Hämodilution	64
1. Veränderungen im KOD des Plasmas und der Lymphe	64

	Seite
2. Korrelation von KOD der Lymphe und Lymphfluß	66
3. Hydrostatischer Druck in implantierten perforierten Kapseln	67
E. DISKUSSION	68
I. Meßmethoden	68
1. Kritischer Vergleich statischer und dynamischer Verfahren	68
2. Die Meßmethode nach A.T. Hansen und die eigene Modifikation	69
II. Membranmaterial	72
1. Auswahl der Membranen	72
2. Das Problem der "Selektivitätsgrenze"	73
III. Ergebnisse physikalisch-chemischer Untersuchungen	75
1. Der KOD makromolekularer monodisperser Lösungen	75
2. Der KOD makromolekularer polydisperser Lösungen	76
3. Der Quellungsdruck von Agar-Gel: Ein Modell und seine physiologische Relevanz	77
IV. Kompensationsmechanismen von intravaskulären osmotischen Druckänderungen	80
1. Das Konzept von Starling, Landis und Pappenheimer	80
2. Negativer interstitieller hydrostatischer Druck	81
3. Variabler interstitieller hydrostatischer Druck	82
4. Hypothese eines variabel dehydrierten interstitiellen Gels	82

	Seite
F. ZUSAMMENFASSUNG	85
G. FORMELBEZEICHNUNGEN	88
H. LITERATURVERZEICHNIS	90

A. EINLEITUNG

Die Eigenschaft von Lösungen, über eine sogenannte semipermeable Membran gegenüber dem reinen Lösungsmittel einen osmotischen Druck auszuüben, wurde von van't Hoff 1887 als Gesetz formuliert (139). Seit den grundlegenden Arbeiten von Starling (129, 130) im Jahre 1896 ist die Bedeutung des osmotischen Druckes der Serum-eiweißkörper (kolloidosmotischer Druck, KOD) für die Physiologie des transkapillären Flüssigkeitsaustausches und die Verteilung des Gesamtkörperwassers eines Organismus bekannt.

Die methodischen Schwierigkeiten der Messung des KOD führten zur Entwicklung zahlreicher Meßverfahren, die großen technischen Aufwand und lange Meßzeiten erforderten und dennoch nicht die wünschenswerte Genauigkeit lieferten. Die Erforschung der physiologischen und pathologischen Vorgänge in der Endstrombahn des Kreislaufs und die Beurteilung der Infusionstherapie mit natürlichen und künstlichen Kolloidlösungen in der Medizin erfordert eine zuverlässige, schnelle und routinemäßig verwendbare Methode zur Messung des KOD makromolekularer Lösungen. Die Entwicklung zunehmend besser geeigneter Ultrafiltrationsmembranen und die Beschreibung eines elektronischen Osmometers durch Hansen (40, 41, 42, 43) im Jahr 1961 schuf die notwendigen Grundvoraussetzungen.

Der routinemäßige Einsatz des Hansen-Osmometers im klinischen und experimentell-medizinischen Labor erforderte methodische Untersuchungen der Probleme, die bei Verwendung dieses Meßsystems, unterschiedlich selektiver Membranen und verschiedener makromolekularer Lösungen auftreten.

Die vorliegende Arbeit schildert diese methodischen Untersuchungen, beschreibt eine daraus entstandene eigene Modifikation des Hansen-Osmometers, berichtet über Ergebnisse der KOD-Messung biologischer Flüssigkeiten und diskutiert Modellvorstellungen über die Mechanismen des transkapillären Flüssigkeitsaustausches.

B. PHYSIKALISCHE CHEMIE UND PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DES KOLLOIDOSMOTISCHEN DRUCKES (KOD)

I. Der osmotische Druck makromolekularer Lösungen

1. Van't Hoff'sches Gesetz

Die Bezeichnung "osmotischer Druck" entstammt Beobachtungen des deutschen Botanikers Pfeffer und des englischen Chemikers Graham um die Mitte des 19. Jahrhunderts (33): Ist eine Lösung eines Stoffes in einem Lösungsmittel durch eine sogenannte semipermeable Membran vom reinen Lösungsmittel getrennt, so erfolgt eine überwiegende Diffusion des Lösungsmittels durch die Membran in Richtung der Lösung und verdünnt diese. Eine ideale semipermeable Membran ist nur für das Lösungsmittel, nicht aber für den gelösten Stoff durchlässig. Diese in einer Richtung überwiegende Diffusion kann durch Anwendung eines Druckes auf die Lösung verhindert werden, der dem osmotischen Druck der Lösung entspricht.

Der holländische Chemiker van't Hoff formulierte 1887 folgende Analogie zwischen idealen Lösungen und Gasen (139): Der osmotische Druck einer Lösung (π) ist direkt proportional der Konzentration (c) eines gelösten Stoffes in einem Lösungsmittel und gleich dem Druck, den die Moleküle des gelösten Stoffes ausüben würden, wenn sie im gasförmigen Zustand ein Volumen einnehmen würden, das dem der Lösung entspricht. Der osmotische Druck ist direkt proportional der absoluten Temperatur (T):

$$\pi = c \cdot R \cdot T \quad (\text{Gl. 1}).$$

- π : osmotischer Druck [N/m^2]
 c : Konzentration [Mol/l]
 R : allgemeine Gaskonstante ($8,316 \text{ [Joule/Mol} \cdot \text{K]}$)
 T : absolute Temperatur [K]

So üben die Moleküle eines gelösten Stoffes einer einmolaren Lösung gegenüber jeglich gearteter Grenzfläche, die sie zusammenhält, einen Druck von 24 atm ($2,43 \cdot 10^6 \text{ N/m}^2$) aus. Ist diese Grenzfläche eine semipermeable Membran, besteht ein osmotischer Druckgradient von

24 atm. Besteht die Grenzfläche nicht aus einer Membran sondern aus der freien Oberfläche des Lösungsmittels, werden die gelösten Moleküle dort reflektiert und dieses erhält aus Gründen des Kräfteausgleichs einen negativen Druck von -24 atm. Diese interne Spannung wird hydraulisch von der Oberfläche auf das Gesamtlösungsmittel übertragen und zeigt sich physikalisch als Abfall des Dampfdruckes des Lösungsmittels um 0,31 mmHg für Wasser als Solvens (Solut-Drucktheorie) (123).

2. Thermodynamische Betrachtungsweise

Die fehlende Übereinstimmung experimentell gewonnener Daten über den osmotischen Druck von Lösungen mit den nach van't Hoff berechneten Werten forderte eine neue Theorie. Ausgangspunkt war dabei, daß nicht kinetische Prinzipien - wie die Vorstellung eines Bombardements der gelösten Moleküle gegen die semipermeable Membran - sondern eine thermodynamische Betrachtungsweise zugrunde gelegt wurden: Nicht die Moleküle des gelösten Stoffes streben in Richtung des reinen Lösungsmittels sondern das Lösungsmittel tritt durch die Membran in Richtung der Lösung. Den thermodynamischen Zustand einer Flüssigkeit beschreibt ihr chemisches Potential. Es gibt zwei Möglichkeiten dieses zu ändern:

- a. Anwendung von Druck erhöht das chemische Potential
- b. die Lösung eines Stoffes erniedrigt es.

Der Übertritt des Lösungsmittels durch die semipermeable Membran von der Lösungsmittelseite zur Lösungsseite ist dementsprechend ein Übergang auf ein thermodynamisch niedrigeres Potential, die Anwendung eines hydrostatischen Druckes auf die Lösung zur Beibehaltung eines Diffusionsgleichgewichtes eine Erhöhung des chemischen Potentials der Lösung.

Eine molekularstatistische Betrachtung liefert dabei folgende Erklärung des osmotischen Druckes (95): Eine gleiche Anzahl von Molekülen verschiedener Gase bei gleichem Volumen und gleicher Temperatur üben den gleichen Druck aus. Es liegt eine identische Statistik der relativen Wahrscheinlichkeit einer Verteilung ihrer Moleküle innerhalb des gegebenen Volumens vor. Im Falle von Lösungen muß jedoch nicht nur die Statistik der Verteilung von Molekülen des

gelösten Stoffes sondern auch die des Lösungsmittels betrachtet werden. Da die beiden Molekülarten verschieden sind, erhöht die Anwesenheit von Solutmolekülen die Anzahl der möglichen statistischen Verteilungen für die Moleküle des Solventen.

Die molare Entropie des Lösungsmittels wird also durch die Anwesenheit von Solutmolekülen erhöht, die molare freie Energie (das chemische Potential) ist entsprechend erniedrigt. Das Lösungsmittel strömt solange durch die semipermeable Membran und erhöht den hydrostatischen Druck der Lösung bis die molare freie Energie des Lösungsmittels in der Lösung gleich der molaren freien Energie des Lösungsmittels beim atmosphärischen Druck ist. Auf die mathematisch formulierte Ableitung aus dem Entropiegesetz soll hier nicht eingegangen werden, es wird auf Standardwerke der Thermodynamik verwiesen (124).

Wesentliche Bedingung dieser statistischen Betrachtungsweise ist, daß die Moleküle des gelösten Stoffes beweglich sind. Für Makromoleküle, wie Proteine, die flexible Ketten darstellen gibt es zwei Möglichkeiten der Beweglichkeit:

- a. In sehr verdünnten Lösungen beeinflusst hauptsächlich die Position des Moleküls als Gesamtheit die Statistik des Lösungsmittels.
- b. In höher konzentrierten Lösungen bewirken die Positionen verschiedener Anteile des Makromoleküls zueinander eine zusätzliche Entropieerhöhung.

Für den osmotischen Druck einer Lösung bedeutet dies einen überproportionalen Anstieg mit zunehmender Konzentration, die Lösung ist in hohem Maße "nichtideal". Es ergibt sich, daß das van't Hoff'sche Gesetz nur für eine Lösung zutrifft, in der die Masse, die Form und die intermolekularen Kräfte aller Komponenten der Lösung gleich sind und diese unendlich verdünnt ist.

3. Der KOD von Proteinlösungen

Eine genaue Berechnung des KOD von Lösungen, die sowohl Proteine als auch Elektrolyte enthalten, ist selbst bei Anwendung der Thermodynamik nicht möglich, kommt es doch zu sehr komplexen Wechselwirkungen zwischen Protein- Protein-, Protein-

Wasser-, Protein- Salz-, Salz- Salz- und Salz- Wasser-Molekülen. Diese intermolekularen Wechselwirkungen entziehen sich einer direkten Berechnung. In Abweichung vom van't Hoff'schen Gesetz läßt sich der KOD makromolekularer Lösungen in einer Potenzreihe der Konzentration (c) des Solutes und einer Funktion des Molekulargewichtes (MG) mit empirisch festgestellten zweiten, dritten und höheren Virialkoeffizienten (A_n) annäherungsweise in Gleichung 2 darstellen:

$$\pi = \frac{R \cdot T}{MG} \cdot c + A_1 \cdot c^2 + A_2 \cdot c^3 + \dots A_n \cdot c^{n+1} \quad (Gl.2)$$

Bei polydispersen Systemen ist an Stelle des Molekulargewichtes (MG) des Solutes das mittlere numerische Molekulargewicht ($\bar{M}_n$) zu setzen (s. S. 7). Dabei wird vorausgesetzt, daß jedes Molekül des gelösten Stoffes unabhängig von den übrigen zum Meßwert beiträgt. Für viele in der Medizin verwendete makromolekulare Lösungen und für das Blutplasma ist $\bar{M}_n$ nicht genau bekannt und individuell verschieden.

Drei Effekte sind hauptsächlich verantwortlich für die Abweichung des KODs von Protein-Salz-Lösungen von einer linearen Funktion der Konzentration:

a. Bindung von Wasser und Salzen

Die Proteinmoleküle binden in Lösung Wasser und Anionen der Salze, abhängig vom pH und der Salzkonzentration. Die Bindung der Wassermoleküle geht in die Proteinkonzentration ein und die Bindung der Anionen vermindert die Anzahl der Ionen, die an der Donnan-Verteilung teilnehmen können.

b. Donnan-Verteilung

Proteinmoleküle sind Polyelektrolyte und in ihrer Ladung nicht neutral. Die pH-abhängige Nettoladung der Proteinmoleküle in einer Elektrolytlösung führt aus Gründen der notwendigen Elektroneutralität auf beiden Seiten einer semipermeablen Membran zu einer ungleichen Elektrolytverteilung (Donnan-Effekt). Eine rechnerische Annäherung des KOD durch Kombination des van't Hoff'schen Gesetzes mit dem Donnan-Effekt (118, 119) ergibt nach Landis (71)

Übereinstimmung bei genau definierten pH-Werten einer Albuminlösung.

c. Die anomale Entropie der Mischung

Die Zahl der möglichen Verteilungen der Moleküle im Lösungsmittel ist beschränkt durch das sogenannte "excluded volume" (64), das ist das Volumen um das Zentrum eines Moleküls, das nicht durch das Zentrum eines anderen Makromoleküls eingenommen werden kann. Ein Extremfall dieser Wechselwirkungen ergibt sich bei makromolekularen Lösungen so hoher Konzentration, daß die einzelnen Solutmoleküle nicht mehr frei beweglich sondern durch sterische Behinderung an die Nachbarmoleküle in ihrer Position fixiert sind. Die Beweglichkeit des Moleküls als ganzes wird nahezu aufgehoben, die innere Flexibilität wird jedoch nur wenig betroffen. Im Grenzfall der Lösung zu diesem Zustand wird die Statistik der Lösungsmittelmoleküle durch die molekularen Wechselwirkungen nur wenig beeinflusst und der KOD kaum verändert (52, 95, 123). Diese "Lösung" ist jedoch nicht mehr mit Lösungsmittel mischbar und es ist keine semipermeable Membran nötig um die Makromoleküle vom Solventen zu trennen: Die Lösung befindet sich im "Gel"-Zustand. Zur "Gel"-Bildung fähige, also sehr hochmolekulare Stoffe mit großem effektiven Volumen¹⁾ üben in einem bi- oder multi-Komponentensystem großen Einfluß auf das Verhältnis anderer gelöster Makromoleküle zu ihrem Lösungsmittel aus, ein Effekt, der größer mit Zunahme der Molekülgröße der konkurrierenden Moleküle wird (72, 75). Diese "Sterische Exclusion" wurde durch Modellversuche mit Gelatinegel von Meyer et al. (90), durch KOD-Messungen an Lösungen von hochmolekularem Dextran, von Hyaluronsäure und Plasmaproteinen (Albumin, Gamma-globulin, Fibrinogen) von Laurent (72, 75) und Preston (107) und durch Lichtstreuungsmessung von Ogston (96) nachgewiesen. Der KOD gemischter Lösungen von Hyaluronsäure und Serumalbumin ist größer als die Summe der KOD der getrennten Lösungen, denn es kommt zu

1) Effektives Volumen: Volumen des Lösungsmittels, das ein Gramm eines Stoffes in freier Lösung einnimmt, z.B. Hyaluronsäure (MG 1 - 5 Millionen) enthält 1 Liter Wasser pro Gramm Substanz in freier Lösung (76).

einer Exclusion von Albuminmolekülen von Teilen der Lösung, die schon durch den sterischen Effekt der Hyaluronsäure "besetzt" sind.

Die Wirksamkeit dieses sterischen Exclusions-Effektes im Multikomponenten-System biologischer Flüssigkeiten scheint insbesondere im interstitiellen Raum von physiologischer Bedeutung zu sein.

4. Terminologie makromolekularer Lösungssysteme

a. Dispersität

Der Grad der Dispersität eines Soluts ist ein Maß für die Anzahl von unterschiedlich großen Molekülen, die in ihm enthalten sind. Eine monodisperse Substanz enthält nur Moleküle gleicher Art und Größe, ein polydisperses Solut-Molekül gleicher oder verschiedener Art und ungleicher Größe.

b. Molekulargewicht bei polydispersen Substanzen

Bei polydispersen Stoffen als Gemisch (Summe) verschiedener Einzelfractionen (n_i) mit unterschiedlichen Molekulargewichten (M_i) lassen sich zur Charakterisierung mittlere Molekulargewichte ermitteln (Gl. 3 und Gl. 4):

Gewichtsmittelwert des Molekulargewichts ($\bar{M}_w$):

$$\bar{M}_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} \quad (\text{Gl. 3})$$

Das $\bar{M}_w$ eines Soluts erhält man durch Messungen der Sedimentation und Diffusion in der Ultrazentrifuge oder der Lichtstreuung.

Zahlenmittelwert des Molekulargewichts ($\bar{M}_n$) (auch mittleres numerisches MG):

$$\bar{M}_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad (\text{Gl. 4})$$

Für die Bestimmung von $\bar{M}_n$ sind Methoden erforderlich, welche die Anzahl der vorhandenen Moleküle erfassen (Osmometrie).

c. Komponentensysteme

Besitzt eine Lösung verschiedene Solutanteile, die sich in ihrem Molekulargewicht gruppenweise unterscheiden, so kann man diese als Lösungskomponenten bezeichnen. Diese Betrachtungsweise erleichtert Untersuchungen der intermolekularen Wechselwirkung (s.S.53).

II. Die physiologische Bedeutung des KOD

1. Die Endstrombahn und ihre Parameter

a. Transkapillärer Flüssigkeitsaustausch

Die Bedeutung des osmotischen Druckes der Serumweißkörper für den transkapillären Flüssigkeitsaustausch ist seit den grundlegenden Arbeiten Starlings 1896 (129, 130) bekannt: Trotz des beträchtlichen Überwiegens des osmotischen Druckes der Kristalloide über den der Kolloide kommt nach Starlings Ansicht nur dem letzteren Bedeutung für den Wasseraustausch zwischen Blut und Geweben zu, da die Permeabilität der Kapillarwand für Elektrolyte die Ausbildung eines kristalloidosmotischen Druckes nicht zuläßt. Die Richtung und Menge des Flüssigkeitsaustausches zwischen Plasma und interstitieller Flüssigkeit sind durch drei Faktoren bestimmt:

- (1) Den hydrostatischen Druck auf jeder Seite der Kapillarmembran,
- (2) den KOD von Plasma und interstitieller Flüssigkeit über die Kapillarmembran,
- (3) den physikalischen Eigenschaften der als mechanischen Filter angesehenen Kapillarmembran.

H. Schade (121) ergänzte 1924 die von Starling durch statische Dialysesysteme gewonnene Betrachtungsweise durch Untersuchungen an künstlichen semipermeablen Modellkapillaren:

Der hydrostatische Druck fällt im Verlauf der Kapillare ab, der kolloidosmotische Druck fällt im Verlauf der Kapillare ab, der kolloidosmotische Druck nimmt durch Abfiltration zu. Ab der Stelle der Kapillare, an welcher der steigende KOD größer als der weitersinkende hydrostatische Druck wird, kommt es zu einer überwiegenden Rückresorption des Ultrafiltrates. Somit findet ein stetiger Kreislauf des Ultrafiltrates von der Kapillare in das Interstitium und zurück statt. Landis (71) beschreibt zwei Arten der parakapillären Zirkulation:

- (1) Filtrations-Absorptions-Zirkulation, die das gesamte Kapillarfiltrat, die gesamte interstitielle Flüssigkeitsmenge und den Teil der interstitiellen Flüssigkeit einschließt, der durch Absorption zurück zum Kapillarblut gelangt.
- (2) Die Kapillarfiltrat-Lymphwegs-Zirkulation, die das gesamte

Kapillarfiltrat und den nichtabsorbierten Teil der interstitiellen Flüssigkeit samt Protein einschließt, den Teil also, der über die feinsten lymphatischen Kapillaren in die Hauptlymphstränge und zurück zum venösen Blut gelangt.

Nach Pappenheimer (104) und Mayerson (87) wird zwischen $\frac{9}{10}$ und $\frac{19}{20}$ der in das Interstitium gefilterten Flüssigkeit im venösen Schenkel der Kapillaren osmotisch rückresorbiert und der Rest auf lymphatischem Weg zurückgeleitet.

Das Starling-Konzept wurde seither durch viele experimentelle Untersuchungen bestätigt und ausgebaut: Landis (68) zeigte, daß durch Steigerung des hydrostatischen Druckes in den Kapillaren proportional der Differenz von Kapillardruck und Plasma-KOD Wasser in das Interstitium austritt. Landis und Gibbon (70), Guyton und Lindsay (36) sowie Areekul (3) bewiesen eine Proportionalität zwischen Nettofluß in das Interstitium und venösem Druck, ebenso Pappenheimer und Soto-Rivera (102). Nach Burgen (13) verursacht eine geringe Erhöhung des interstitiellen Flüssigkeitsvolumens eine deutliche Erhöhung des Lymphflusses und damit eine Erniedrigung der interstitiellen Proteinkonzentration.

b. Transkapillär wirksame Parameter

Landis und Pappenheimer (71) formulierten das Starling-Konzept wie folgt (Gleichung 5):

$$FM = K (P_c - \pi_p - P_t + \pi_t) \quad (Gl. 5)$$

Zur Definition und zum Verständnis dieser einzelnen Parameter ist es erforderlich auf die Problematik ihrer Bestimmung einzugehen und zugleich moderne Vorstellungen des transkapillären Austausches von Flüssigkeit und Makromolekülen aufzuzeigen. Dies soll in der Reihenfolge des Erscheinens der Parameter in der Landis'schen Gleichung geschehen.

FM: Nettoflüssigkeitsaustausch von der Kapillare in das Interstitium.

Die Bestimmung erfolgt durch vitalmikroskopische Beobachtung

an einzelnen Kapillaren (45), als mikromethodische Messung des Flüssigkeitsvolumens pro Zeiteinheit, Oberflächeneinheit und Druckänderungseinheit (69) oder als Makromethode (3) durch gravimetrische Messungen an isoliert perfundierten Organen oder Geweben.

K: Filtrationskoeffizient. Er ist spezifisch für die Kapillarwand-eigenschaften und nicht nur Ausdruck der morphologischen Struktur sondern auch der chemischen und neurohumoralen Faktoren (29, 32) und der pathophysiologischen Veränderungen (29, 151), denen die Kapillarwand unterworfen ist. Grundvoraussetzung der Starling'schen Hypothese ist, daß die Kapillarwand die Ausbildung eines kolloidosmotischen Druckes ermöglicht, also für Makromoleküle nicht oder nur wenig permeabel ist. Diese These soll Anhand morphologischer und physiologischer Untersuchungsergebnisse diskutiert werden: Die Beobachtung, daß die Ascitesflüssigkeit, die Ödemflüssigkeit sowie das Glomerulumfiltrat der Niere in ihrer Zusammensetzung einem durch künstliche Membranen ultrafiltrierten Blutserum ähnlich sind und daß sich die Filtration durch periphere Kapillaren und die durch künstliche Membranen umgekehrt zur Viskosität und damit auch der Temperatur ändert, führten zur Porentheorie (103) der Kapillarpermeabilität. Danach befinden sich zwischen den Endothelzellen der peripheren Kapillare zahlreiche ultramikroskopische Öffnungen, die Wasser und gelösten Molekülen bis zu einer bestimmten Größe die Diffusion in das Interstitium erlauben. Die Endothelzellen selbst ermöglichen nur den Blutgasmolekülen und den lipidlöslichen Molekülen den Durchtritt. Nach Pappenheimer (103) umfaßt die für die Wasserfiltration verfügbare Fläche der Kapillarwand nur 0,2% der histologischen Fläche, für größere Moleküle ist sie noch geringer. Ähnlich der Berechnung der Porengrößen von Zellulosemembranen (s.S. 35), läßt sich über das Poiseullesche Gesetz für die Kapillarporen ein effektiver Porenradius berechnen. Pappenheimer (103) ermittelt einen mittleren Durchmesser für kreisförmige, zylindrische Poren von $30 - 45 \text{ \AA}$ bei einer Anzahl von $1 - 2 \cdot 10^9 / \text{cm}^2$. Experimentell zeigt sich eine progressive Abnahme der Kapillarpermeabilität in Abhängigkeit zur ansteigenden Molekülgröße (35, 59, 71, 87, 103, 150). Wenn die Dimensionen der Poren und der Solutmoleküle vergleichbar werden, findet keine freie Diffusion (Ficksches Ge-

setz) sondern eine beschränkte Diffusion statt (110, 111). Der Koeffizient für die beschränkte Diffusion nimmt mit der Größe der gelösten Moleküle zu.

Unter der Voraussetzung, daß die Lymphe weitgehend das Kapillarfiltrat repräsentiert (24), führte der Nachweis von Makromolekülen in der Lymphe, die größer als die hypothetischen Kapillarporen sind, zur Annahme eines zusätzlichen "großen Porensystems" (86) oder Kapillarwandlückensystems (26).

Das Ausmaß des Molekularsiebeffektes für einen beliebigen gelösten Stoff hängt vom Verhältnis des Reflektionskoeffizienten (s.S. 38) zur Größe des durch die Kapillarwand fließenden Volumens ab. Bei abnorm niedrigen Filtrationsraten verringert sich also der Molekularsiebeffekt und die Ausbildung eines Diffusionsgleichgewichtes wird sogar für Proteinmoleküle möglich. Zugleich beeinflusst der Lymphfluß die Verteilung der Makromoleküle im interstitiellen Raum in Abhängigkeit vom Produkt aus dem Membran-Permeabilitätskoeffizienten (s.S. 33) und der Kapillarwandfläche (57). Für kleinere Moleküle ist die Diffusionsgeschwindigkeit um ein vielfaches größer als die Filtrationsgeschwindigkeit und der Molekularsiebeffekt ist vernachlässigbar. Der Konzentrationsquotient definierter Makromoleküle zwischen Plasma und Lymphe läßt sich nach zahlreichen Verfahren zur Berechnung der Kapillarwandpermeabilität und der Porengrößen verwenden (35, 57, 71, 114, 115). Dabei wird jedoch von einigen Autoren nicht berücksichtigt, daß die so kalkultierten Permeabilitätskoeffizienten für Makromoleküle infolge ihrer molekularen Dimensionen näher mit ihren freien Diffusionskoeffizienten oder effektiven hydrodynamischen Radii korrelieren als mit ihren Molekulargewichten (113).

Es herrscht weitgehende Übereinstimmung in der Annahme eines kleinen Porensystems mit Porengrößen von etwa $40 \text{ \AA}$ und eines physiologisch wirksamen Systems größerer Poren oder Lücken mit Radii von 200 bis $350 \text{ \AA}$ (26, 35) oder 600 bis $800 \text{ \AA}$ (28, 149). Anstelle des Durchtritts größerer Makromoleküle durch ein Kapillarwandlückensystem wird auch ein vesikulärer Transport (Cytopenmpsis) durch Endothelzellen diskutiert (11, 12, 71, 87, 138, 149). Morphologische elektronenoptische Untersuchungen des Kapillarbettes mit kolloidalen Suspensionen von elektronendichten Partikeln (Peroxydase, Ferritin,

Eisenoxid, kolloidales Gold) ergaben zahlreiche Hinweise für einen transendothelialen Transport durch Vesikel von einem inneren Durchmesser zwischen 400 und 700 Å (11, 12, 14, 58, 59, 60). Nach Casley-Smith (14) sind 25 bis 35% des nichtnukleären Zellvolumens der Endothelzelle Vesikel mit einer durchschnittlichen Lebenszeit von 1,5 Sekunden. Für die Energie zum vesikulären Transport kann teilweise (12, 127) oder vollständig (14) die Brownsche Molekularbewegung verantwortlich sein. Entsprechend einer zufallsstatistischen Vesikelrichtung findet der Transport in Richtung des Diffusionsgradienten der Makromoleküle statt.

Eine weitere morphologisch-physiologische Korrelation läßt sich für das "kleine Porensystem" der Kapillarwand finden:

Die Betrachtungen beziehen sich auf den beim Säugetier dominierenden Kapillartyp, den sogenannten kontinuierlichen Kapillaren mit kontinuierlichem Endothelanteil und kompletter durchgehender Basalmembran (quergestreifte Muskulatur, Myokard, Lunge, zentralnervöses System, glatte Darmmuskulatur, subkutanes Gewebe, Fettgewebe, Placenta). Auf andere Kapillartypen und deren regionale Verschiedenheit soll hier nicht eingegangen werden, es wird auf die entsprechende Literatur verwiesen (15, 16, 83, 86, 93, 109, 143). Nach Karnowski (60) läßt sich das "kleine Porensystem" als Verbindungszonen zwischen einzelnen Endothelzellen deuten. Diese Interzellularbrücken verbinden die durchschnittlich 200 Å voneinander entfernten Endothelzellen im luminalen Drittel der Spalten als sogenannte zonulae occludentes (11, 12) vollständig oder als maculae occludentes mit intermittierenden Lücken von 40 Å (60).

Untersuchungen an der jedoch heterogen aufgebauten Nierenglomerulum-Kapillarwand lassen nach Arturson (5, 6) neben dem morphologischen Poreneffekt noch die Wirksamkeit eines Gel-Filtereffektes der interzellulär und in der Basalmembran nachweisbaren sauren Mucopolysaccharid-Komplexe vermuten. Garby und Areekul (27) schließen aus einer unterschiedlichen Restriktion von neutralen und sulfatsubstituierten Dextranen auf das Vorhandensein einer negativ geladenen Matrix.

P_c : Der intrakapilläre hydrostatische Druck P_c kann durch Mikropunktionen, plethysmographische oder isogravimetrische Messun-

gen an isolierten Organen bestimmt oder kalkuliert werden (27, 69, 70, 102, 144). Er beträgt im arteriellen Schenkel der Kapillare etwa 32 mmHg, im venösen Anteil etwa 15 mmHg. Dabei sind die Kapillaren zeitweise durch rhythmische Kontraktionen der präkapillären Sphinkter und Metaarteriolen vom arteriellen Drucksystem abgeschirmt und nur dem Druck des venösen Systems ausgesetzt (146).

π_P : Der KOD des Plasmas wird in-vitro gemessen oder aus der Plasmaproteinkonzentration und der Elektrophorese nach empirischen Formeln kalkuliert. Beide Verfahren werden später geschildert und diskutiert. Der Absolutwert liegt um 30 mmHg (66, 71). Hansen (42) diskutiert die Möglichkeit eines zusätzlichen Einflusses auf den intravasalen KOD durch einen osmotischen Effekt der Erythrozyten bei der Kapillarpassage.

π_t : Der interstitielle KOD entzieht sich aus methodischen Gründen jeder Messung (keine Möglichkeit einer Probengewinnung). Unter der Voraussetzung, daß im Fließgleichgewichtszustand die regionale Lymphe das Endsubstrat des transkapillären Flüssigkeits- und Proteinaustausches darstellt und somit die interstitielle Proteinkonzentration repräsentiert, werden Ergebnisse aus Lymphproteinbestimmungen den tatsächlich vorliegenden interstitiellen Verhältnissen gleichgesetzt (24, 80, 141). Untersuchungen, denen zufolge sich 24 bis 50% des gesamten extrazellulären Proteins im interstitiellen Raum befinden (31, 141) ergeben zusammen mit Lymphproteinbestimmungen nach Garlick (28) eine Eiweißkonzentration von 1,1 bis 2,4 g%. Diese Proteinkonzentration entspräche einem KOD von etwa 2 bis 5 mmHg. Vernachlässigt wird bei diesen Kalkulationen der Einfluß der interstitiellen Grundsubstanz auf die Aktivität der Proteinlösung (sterischer Exklusionseffekt). Gerade dieser komplexen Wechselwirkung kommt jedoch nach Wiederhielm (145) große Bedeutung zu.

P_t : Über die Natur und Größe des interstitiellen Druckes P_t herrscht Uneinigkeit. Abhängig von der praktizierten Meßmethode werden unterschiedliche Ergebnisse erzielt: In das Gewebe eingestochene Nadeln, Kapillaren und Mikrobällone ergeben positive Drucke von 1 bis 3 mm Hg (71), während implantierte, perforierte Kapseln (37, 38, 39) und eingestochene, mit Baumwollfasern als Dochte versehene Teflon-

kapillaren (66, 122, 136) negative Drucke von 2 bis 8 mmHg, also subatmosphärische Werte liefern. Eine Übersicht und Besprechung der einzelnen Methoden findet sich bei Guyton et al. (39), der diese unterschiedlichen und sich widersprechenden Meßergebnisse mit folgendem Konzept erklärt:

Die einzelnen Meßmethoden erfassen präferentiell drei verschiedene im Gewebe vorliegende Arten des interstitiellen Druckes. Dabei setzt sich der "Gesamtgewebedruck" aus dem "negativen interstitiellen Flüssigkeitsdruck" und einem von den festen Strukturen ("solid tissue structures") des Gewebes, wie retikuläre und kollagene Fasern, sowie elastischen Muccopolysaccharid-Gel-Strukturen ausgeübten "positiven Druck" zusammen. Der elastische "Geldruck" beinhaltet einen inneren Flüssigkeitsdruck im Gel und einen Rückprall ("recoil") des Gelretikulums und hat die Funktion einer Kraftübertragung in interstitiellen Raum.

Nach Auffassung Guytons werden mit der Mikronadel- oder Mikropipettenmethode die soliden Strukturen voneinander getrennt, da beide zur Messung ein freies Wasser-Kompartement im Gewebe erfordern, der "solid tissue" - Druck fällt auf Null ab und der interstitielle Flüssigkeitsdruck erreicht den "Gesamtgewebedruck" (etwa atmosphärischer Druck). Die Ballonmethode stellt den Kontakt mit den soliden Strukturen und der Gewebeflüssigkeit her und mißt damit den "Gesamtgewebedruck". Dagegen kommt es nach Implantation der perforierten Kapseln oder Einführen der Baumwollmatrixkapillaren ("wick-technique") in das Bindegewebe zum Flüssigkeitsgleichgewicht mit der interstitiellen Flüssigkeit und es entsteht dadurch ein interstitieller Raum, der nicht durch eine Kraftübertragung des atmosphärischen Druckes im Gewebe kollabieren kann (fluid equilibration technique).

Bei Punktion dieser Kapsel mit einer Nadel unter gleichzeitiger Druckmessung oder direkter Verbindung der Baumwollfaserkapillare mit einem Manometer soll somit der "negative interstitielle Flüssigkeitsdruck" direkt gemessen werden. Ursache dieses Druckes sollen neben dem KOD des intravasalen Proteins Pumpeffekte des lymphatischen Systems, physische Bewegungen des Bindegewebes und die Fortleitung der vaskulären Pulsation in das Bindegewebe sein.

Dieses von Guyton et al. (37, 39) 1963 erstmals vorgeschlagene und später erweiterte Konzept der Kräfte des transkapillären Flüssigkeitsaustausches soll anhand der Ergebnisse eigener experimenteller Untersuchungen diskutiert werden (s. S. 81).

2. Die Bedeutung des KOD für den Gesamtorganismus

Zwei wichtige Aspekte der Bedeutung des KOD für den Gesamtorganismus beschreibt Landis (71):

a. Die Auswirkung des überproportionalen Anstiegs des KOD mit der Proteinkonzentration (nicht-ideales Verhalten) verstärkt die Kräfte, welche die Homöostase des Blutvolumens bewirken. So kommt es bei Hämokonzentration durch einen Plasmaverlust von 30 ml/100 ml Blut zu einem Anstieg des KOD um 18 mmHg (nach van't Hoff wären es nur 6 mmHg), der weiterem Flüssigkeitsverlust entgegenwirkt. Bei Hämodilution kommt es zu entsprechend großer Verringerung des KOD. So ist nach Landis (71) der KOD ein limitierender Faktor für die Glomerulumfiltration der Niere: Eine Glomerulumfiltration von 0,45% ist der höchstmögliche Wert bei normaler Plasmaproteinkonzentration (70 g/l) und normalem hydrostatischen Druck in den Glomerulumkapillaren (70 mmHg).

b. Bei kleinen Proteinkonzentrationen, wie sie in der interstitiellen Flüssigkeit vorliegen, verhalten sich die Proteine nahezu wie eine ideale Lösung von Makromolekülen mit einem Molekulargewicht von 90 000. Es resultiert eine fast lineare Abhängigkeit des KOD von der Konzentration im Bereich großer prozentualer Veränderungen der Proteinkonzentration. Der osmotische Koeffizient $d\pi/dc$ ist klein. Demgegenüber ist der osmotische Koeffizient bei der hohen Proteinkonzentration des Plasmas fast dreimal größer, sodaß sich dieses wie eine ideale Lösung von Proteinen des Molekulargewichts 37 000 verhält. Nach dem van't Hoff'schen Gesetz müßte eine Plasmaproteinkonzentration von etwa 12g/100 ml vorliegen um den physiologischen KOD des Plasmas auszuüben. Die Viskosität einer so konzentrierten Proteinlösung hätte aber einen mehr als doppelt so hohen peripheren Widerstand zur Folge. Eine ideale Lösung von Molekülen des Molekulargewichtes 37 000 würde jedoch die Kapil-

larwand passieren, eine Balance des kapillären hydrostatischen Druckes wäre nicht möglich.

In Fortentwicklung von Starlings und Schades Auffassung wurde von vielen Autoren der KOD und seine Wirkung zu starr auf den Gesamtorganismus angewandt und ihm die tragende Rolle bei der Regulation des Körperwasserhaushaltes zugesprochen (91). Im Vordergrund der Betrachtungen standen dabei Entstehung und Resorption von Ödemen und die Wasserausscheidung in der Niere. Erst als aktive Leistungen der kapillaren Membranen und der hormonale Einfluß darauf bekannt wurden, zeigte sich, daß der KOD in der Regelung des gesamten Körperhaushaltes nur einen Parameter unter vielen darstellt. Die Veränderung dieses Parameters bei verschiedenen Erkrankungen gibt Meyer (91) in einer Übersicht an: Dabei zeigt sich bei Nephrose, Herzinsuffizienz mit Ödemen, Leberzirrhose mit Aszites, Polyzythämie, Beri-Beri, anaphylaktischen Ödemen, Hungerödemen und Kachexien eine Verminderung des Serum-KOD, beim multiplen Myelom (9) und Myxödem eine Erhöhung des KOD. Dies ist theoretisch ersichtlich, kommt es doch bei den genannten Erkrankungen zu Veränderungen der Proteinkonzentration oder Proteinzusammensetzung (Albumin/Globulinquotient) des Serums, zur Änderung der Kapillarpermeabilität, des Kapillardruckes oder des interstitiellen Druckes.

Die nicht überall vorliegende Übereinstimmung der Autoren liegt zum einen Teil daran, daß verschiedene Autoren voneinander abweichende Mittelwerte des KOD von normalem menschlichen Blutserum angeben, zum anderen und bedeutenderen Teil an den unterschiedlichen Methoden und den großen methodischen Schwierigkeiten der Messung des kolloidosmotischen Druckes.

C. METHODIK

I. Meßmethoden zur Bestimmung des KOD von Proteinlösungen

1. Statische Methode

Die Statische Methode ist das einfachste Verfahren zur Messung des osmotischen Druckes makromolekularer Lösungen. In Abwandlung der "Pfefferschen Zelle" unternahmen als erster E.H. Starling (130) und später Lazarus-Barlow (77) KOD-Messungen mit folgender, schematisch dargestellter Methode (Abb. 1).

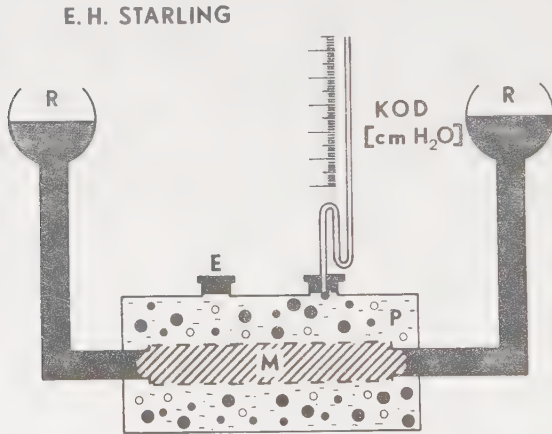


Abb. 1: Methode zur Messung des kolloidosmotischen Druckes von Proteinlösungen nach E.H. Starling (130): Eine aus Silbergitter hergestellte Röhre ist von einer aus Peritonealmembran und Gelatine hergestellten semipermeablen Membran (M, schraffiert) überzogen, mit physiologischer Kochsalzlösung (Raster) gefüllt und steht mit zwei Reservoirren (R) in Verbindung. Durch den verschließbaren Einfüllstutzen (E) wird in den Raum um die Röhre die Proteinlösung (P) eingebracht. Diese steht mit einem Steigrohr in Verbindung. Durch transmembranöse Diffusion der Kochsalzlösung in die

Proteinlösung steigt der Meniskus des Steigrohres bis der hydrostatische Druck im Steigrohr dem KOD der Proteinlösung gleich ist. Der KOD-Meßwert ergibt sich dann aus dem Endwert der Meniskuseinstellung.

Obgleich es im Verlauf der Messung zu einer Verdünnung der Proteinlösung kommt, wird diese Methode bis heute in zahlreichen apparativen Modifikationen angewandt.

2. Dynamische Methoden

Die meist angewandte Methode geht auf das Verfahren von Soerensen (128) zurück: Das Ansteigen des Solvens (Kochsalz) in der Meßkapillare wird durch einen dosierbaren Gegendruck vermindert oder ganz verhindert. Diese Gegenkraft wird durch eine Niveauser-schiebung eines mit dem Steigrohr kommunizierenden Gefäßes erzeugt und mit einem Manometer gemessen. Die Bewegung des Meniskus wird mit einem Horizontalmikroskop beobachtet. Meßtechnisch werden dabei folgende Methoden angewandt:

a. Vorgabe eines Gegendrucks in Höhe des zu erwartenden KOD. Dieses einfachste Verfahren geht auf Tamman (137) zurück und ist eine Zwischenlösung von statischen und dynamischen Methoden.

b. Methode der halben Summen: Die Einstellung des Gegendrucks wird einmal von zu hohen und einmal von zu niedrigen Steighöhendifferenzen durchgeführt. Zwischen beiden Einstellkurven ($dh = f(t)$) wird interpoliert und als osmotischer Druck im Gleichgewicht der Interpolationswert angesehen, der über die weitere Versuchszeit konstant bleibt.

c. Überdruckmethode: Es wird ein äußerer Überdruck vorgegeben. Die beobachtete Einstellungsgeschwindigkeit wird als Funktion des Überdrucks aufgetragen und graphisch oder rechnerisch auf die Einstellungsgeschwindigkeit Null extrapoliert.

d. Vollautomatische Kompensationsmethode: Die Steuerung des Gegendrucks erfolgt vollautomatisch über eine Lichtschranke, welche die Verschiebung einer Luftblase in der Meßkapil-

lare registriert. Diese Methode wurde erst durch die Verwendung elektronischer Bauelemente möglich (17).

3. Modifikationen

Die Methoden von Starling und Soerensen wurden von vielen Autoren modifiziert. Die wichtigsten Modifikationen stammen von Breitenbach und Forster (10), Hellfritz (46), Hepp (49), Hill (50), Krogh und Nakazawa (62), Schade und Claussen (120) und von Schulz (125). Eine Übersicht der konstruktiven Merkmale und Meßeigenschaften verschiedener Osmometertypen findet sich bei Hellfritz und Krämer (47). Die angegebenen Osmometer unterscheiden sich im wesentlichen in den benötigten Probenvolumina (0,5 bis 10 ml), den Einstellzeiten (3 Std. bis 10 Tage), der Reproduzierbarkeit (0,2 bis 3,0 cmH_2O) und den verwendeten Membranen. Eine Ausnahme bildet die vollautomatische Kompensationsmethode, die mit Probenvolumina von 0,5 bis 1,0 ml und einer Meßzeit von etwa 10 bis 15 Minuten auskommt. Diese komplizierte Methode ist im wässrigen System durch Verunreinigung schwer zu handhaben und unbefriedigend.

4. Methode nach A. T. Hansen

Die Einführung elektronischer Manometer in die direkte Osmometrie durch Hansen (40, 41), Meehan et al. (88), Pappenheimer und Lin (105), Rowe (117) und schließlich die Entwicklung eines elektronischen Osmometers durch Hansen (43) erbrachte einen großen Fortschritt in der KOD-Messung von Blutserum.

a. Meßanordnung

Das in dieser Arbeit verwendete und modifizierte Hansen-Osmometer¹⁾ besteht aus zwei funktionellen Einheiten: Meßkammer und Elektromanometer. Abbildung 2 zeigt ein Schema des Meßverfahrens:

Zwischen den beiden Stahlplatten der Meßkammereinheit ist die Membran eingespannt. Die obere Platte läßt ein konisches Rezeptakulum frei, in das die Proteinlösung (100 mm^3) eingebracht wird. Durch

¹⁾: S & W Hansen-Osmometer HO-66, SIMONSEN & WEEI, Albertslund, Denmark

A.T. HANSEN

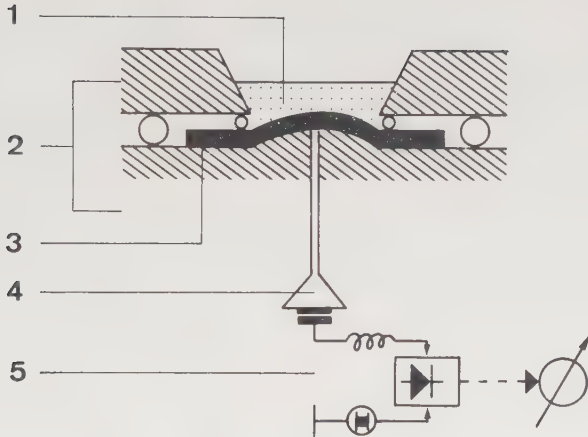


Abb. 2: Schema des Verfahrens zur Messung des
kolloidosmotischen Druckes nach A.T. Hansen (43):
Bildbezeichnung 1: Meßprobe der makromolekularen

Lösung

2: Meßkammereinheit

3: Membran

4: Manometerkammer

5: Elektronikteil des Manometers

einen O-Ring wird die Membran fest auf die gewölbte, glatte Fläche eines mit einer durchgehenden zentralen Bohrung versehenen Zylinders gepreßt. Dieser ist in einen zylindrischen Hohlraum der unteren Platte eingepaßt und läßt einen dünnen, konzentrischen Spalt frei, der die Hauptverbindung zu der Manometerkammer herstellt. In und unter der Membran, sowie in der Manometerkammer befindet sich isotone Elektrolytlösung ($0,386 \text{ cm}^3$). Der von der eingebrachten Proteinlösung ausgeübte KOD wird als Unterdruck in dem Elektromanometer kapazitiv gemessen: Druckproportionale Veränderungen der Kapazität eines Kondensators führen zur Verstimmung eines Schwingkreises. Die variable Frequenz wird mit der stabilen eines Quarzschwingkreises gemischt, die resultierende Frequenz in Spannung umgesetzt, verstärkt und auf einem Kompensationsschreiber registriert. Der Linearitätsfehler des Manometers beträgt weniger als 2% von +300 bis -300 mmHg und zwischen 0 bis -50 mmHg unter 1%. Die Volumenverschiebung pro mmHg beträgt nur $3 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3$. Der Erhaltung dieses hohen Volumenelastizitätskoeffizienten durch Vermeidung von Balloneffekten der Membran fällt für die Meßgenauigkeit und Kürze der Meßzeit eine entscheidende Rolle zu. Mit der von Hansen verwendeten Membran¹⁾ ergab sich eine Volumenverschiebung von $4 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3/\text{mmHg}$. Bei einem Membranzvolumen von etwa 4 mm^3 wird also bei normalen Druckbereichen von etwa $30 \text{ cmH}_2\text{O}$ nicht einmal das Flüssigkeitsvolumen in der Membran verschoben, die Verdünnung des Probenvolumens von 100 bis 200 mm^3 kann vernachlässigt werden.

Auf der Meßkammereinheit sitzt, mit einem O-Ring abgedichtet, ein Plexiglasdeckel, der Öffnungen besitzt für das Eintropfen und Absaugen der Probe und das Einleiten verschiedener Gase, denen die Meßprobe ausgesetzt werden kann. Meßkammer und Elektromanometer befinden sich zum Ausgleich von Temperaturschwankungen in einem Wasserbad.

b. KOD-Messung von Serum und Plasma

Für die Gewinnung und Aufbereitung der Meßproben empfiehlt Ladegaard-Pedersen (65) folgendes Vorgehen:

¹⁾: Ultrafine Filter Type U. A. Dense, Fa. Schleicher und Schüll Dassel/Kr. Einbeck, BRD

- (1) Vermeiden von Hämolyse (diese erhöht den KOD) in der Blutprobe.
- (2) Sofortiges Abzentrifugieren der Erythrozyten und Aufbewahren des Serums bei 4°C nicht länger als eine Woche und vor Verdunstung geschützt.
- (3) Blutentnahme aus einer Arterie, zentralen Vene oder aus einer peripheren Vene während möglichst kurzer Stase.
- (4) Bei bettlägerigen Patienten verringern sich die physiologischen KOD-Schwankungen (67).

Nach Losowski (81), Marty und Intaglietta (84) und eigenen Erfahrungen kann der Zusatz von Antikoagulantien wie Kochsalz-EDTA-Lösungen, Natriumcitrat und ACD bei Verwendung engporiger Membranen die KOD-Messung verfälschen. Es empfiehlt sich, die Blutproben zu heparinisieren.

II. Eigene Modifikation der Meßmethode nach

A.T. Hansen

1. Meßanordnung

a. Thermostasierung

Die Originalmethode arbeitet bei Raumtemperatur. Dazu genügt die Dämpfung von Raumtemperatschwankungen durch ein Wasserbad. Messungen unterhalb oder oberhalb der Raumtemperatur, wie zum Beispiel im physiologischen Bereich um 37°C erfordern eine Thermostasierung. Der verwendete Thermostat¹⁾ oszilliert um den Regelpunkt und führt zu minimalen Temperaturschwankungen im Wasserbad. Diese führen zur Ausdehnung und Zusammenziehung des Wassers im submembranösen Raum der Meßkammer und es kommt zu Druckveränderungen und "pumpenartigen" Volumenverschiebungen durch die Membran. Die Wasserpermeabilität aller zur Verfügung stehenden Membranen²⁾ ist zu gering um einen sofortigen Druckausgleich zu ermöglichen. Dieser Effekt führt zu einer wellenförmigen Deformierung der Meßkurve (Abb. 3).

Eine Mantelthermostasierung durch einen Plexiglaszylinder³⁾, der um das Manometer und die Meßkammereinheit ein zweites Wasserbad schafft dämpft die Temperaturschwankungen auf nicht mehr meßbare und sich nicht mehr auf die Nulllinie auswirkende Größen. Die Nulllinie stellt sich auf einen Mittelwert ein.

Zur Konstanterhaltung der Temperatur des über der Membran befindlichen Meßkammeranteiles und des Luftvolumens im Probenraum wurden zwei Wege beschritten:

1. Das für die Spülung benötigte Lösungsmittel läuft von einer Infusionsflasche durch einen in das Wasserbad gehängten Wärmeaustauscher und von dort unter Wasser durch einen Silikongummischlauch unmittelbar auf die Membran.

1): Rührthermostat, Fa. Braun Melsungen

2): Membranmaterial s.S. 40

3): Der Plexiglaszylinder hat eine Länge von 11,3 cm, einen äußeren Durchmesser von 6 cm und eine Wandstärke von 0,5 cm.

TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER NULLLINIE

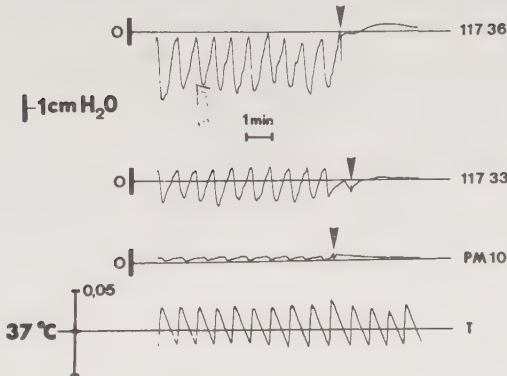


Abb. 3: Temperaturabhängigkeit der Nulllinie der Meßkurve (Originalregistrierungen)

Abhängig von der Wasserpermeabilität der verwendeten Membranen (SM 11736, SM 11733, PM 10) führen geringe Temperaturschwankungen zu Druckveränderungen in der Meßkammer.

Pfeil: Elimination des unerwünschten Effektes durch eine zusätzliche Mantelthermostasierung.

2. Es wurde ein kleiner Plexiglasdeckel konstruiert, der vollständig mit Wasser bedeckt werden kann. Für die Probenaufbringung ragt ein Röhrchen über die Oberfläche des Wasserbades heraus. Dieser Deckel hat zudem den Vorteil, daß er durch die weitgehende Vermeidung einer Luftkonvektion eine hohe Wasserdampfsättigung im Probenraum hält, die einer Verdunstung der Meßprobe entgegenwirkt. Den Einfluß der Temperatur und der Luftkonvektion auf die Verdunstung einer im Rezeptakulum befindlichen Proteinklösung zeigt Abb. 4: Die aus der Verdunstung resultierende Konzentrationszunahme führt zur Erhöhung des KOD der Lösung in Abhängigkeit von der Zeit und ist vom Volumen der Eiweißlösung und von der Temperatur abhängig. Beachtenswert ist dabei, daß man bei Messungen im Temperaturbe-

reich über 30°C das Meßvolumen nicht zu niedrig wählt damit kein Meßfehler durch Verdunstung entsteht.

Der verkleinerte Plexiglasdeckel erlaubt also bei höheren Temperaturen und mit kleineren Probevolumina fehlerfrei Messungen durchzuführen.

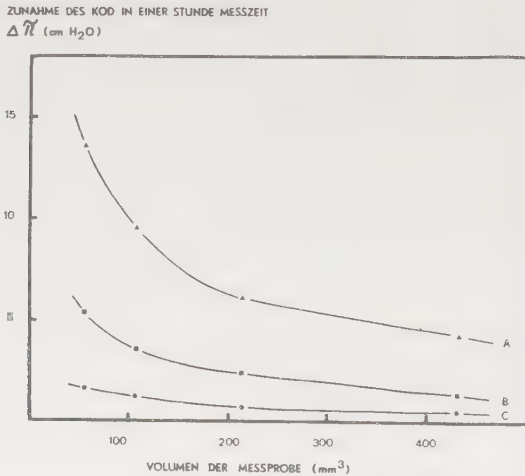


Abb. 4: Konzentrationserhöhung durch Verdunstung der Meßprobe und ihre Auswirkung auf den KOD

Abszisse: Volumen der Meßprobe (mm^3)

Ordinate: Zunahme des KOD der Meßprobe (π) nach einer Stunde Meßzeit

Kurve A: Originalmeßkammer, Temp. 37°C

Kurve B: Originalmeßkammer, Temp. 30°C

Kurve C: Modifizierte Meßkammer, Temp. 37°C

b. Vorrichtung zur Saugung und Spülung

Für Routinemessungen einer größeren Anzahl von Proteinlösungen ist eine zeitsparende, membranschonende und sehr gründliche Spülung mit Lösungsmittel aller mit der Probe in Kontakt kommenden Teile des Osmometers erforderlich um Meßfehler durch Verschleppung von Probe und Spülflüssigkeit zu vermeiden. Die Flüssigkeit im Rezeptakulum muß möglichst vollständig von der Membran und aus dem Rezessus zwischen Rezeptakulumrand, O-Ring und Mem-

bran abgesaugt werden. Dazu dient eine feine Kanüle, die an der Wand des Rezeptakulums fixiert wurde und bis auf etwa 0,2 mm an die Membranoberfläche heranreicht. Über einen Silikonkautschukschlauch, der durch den Deckel führt, ist sie mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden. Zwei am Wasserbehälter installierte Quetschhähne erlauben eine feine Dosierung des Soges. Eine effektive Spülung muß die Rezeptakulumfläche, den Rezessus und die Membran turbulent überströmen.

Das geschieht über eine ebenfalls fest installierte Kanüle, die durch eine seitliche, abgedichtete Bohrung im Deckel führt, rechtwinklig abgebogen ist und einen scharfen Strahl auf die Mitte der Membran richtet. Die turbulente Strömung entsteht durch den schräg auftreffenden Strahl und den ansetzenden Sog der Absaugkanüle. Die Spülkanüle ist durch Silikonkautschukschläuche mit dem Wärmeaustauscher verbunden und wird von einer konventionellen Infusionsflasche mit Lösungsmittel versorgt. Durch einen Quetschhahn läßt sich die Menge der durchlaufenden Flüssigkeit steuern.

Somit liegt eine aufeinander abstimmbare Spülung und Saugung vor, die bei richtiger Einstellung eine selbständige, kontinuierliche Spülung aller mit der Probelösung in Berührung kommenden Osmometer-teile erlaubt, ohne daß die Gefahr des Überlaufens des Rezeptakulums oder der Austrocknung der Membran besteht.

c. Zusatzdichtung und Membrandurchmesser

Bei Verwendung von Membranen sehr hoher Wasserpermeabilität - insbesondere sogenannter anisotroper Membranen - gelingt es auch bei starkem Andruck des O-Ringes nicht, eine Abdichtung in seitlicher Richtung zu erreichen. Während der Messung findet somit ein Ausgleich des submembranösen Unterdruckes durch einen Radialfluß innerhalb der Membran unter dem O-Ring hindurch statt, der bei den nur kleinen erforderlichen Volumenverschiebungen einer Messung große Meßfehler ergibt. Dieser Radialfluß läßt sich durch Verwendung einer flachen äußeren Dichtung zusätzlich zum O-Ring eliminieren. Diese zweite Dichtung überdeckt zugleich den Rand der Membran und die Metallfläche außerhalb der Membran. Somit kann von dem kapillären Spalt zwischen den beiden zusammengeschraubten Meßkammeranteilen keine Volumenverschiebung in die Membran stattfinden.

Der Membrandurchmesser wurde von 25 mm der Originalmethode auf 12 mm verkleinert. Damit vermeidet man eine Faltenbildung der Membran beim Aufpressen des O-Ringes auf die gewölbte Membranunterlage, erzielt ein gutes Einpassen der zweiten Dichtung und spart Membranmaterial.

d. Meßregistrierung

Zur fortlaufenden Registrierung des Einstellvorganges der KOD-Messungen dient ein Spannungskompensationsschreiber¹⁾ mit folgender Charakteristik (Herstellerangaben): Linearität $\pm 0,2\%$ vom Meßbereichsendwert, Totzone kleiner $0,2\%$ vom Meßbereichsendwert, Temperatureinfluß kleiner oder gleich $0,2\% / ^\circ\text{C}$ Raumtemperaturänderung im Bereich $10 - 40^\circ\text{C}$, Einstellzeit $0,8 \text{ sec}$ über die volle Schreibbreite.

Für Routinemessungen erfolgt seine Eichung auf 20 cm Schreibbreite entsprechend $40 \text{ cmH}_2\text{O}$. Die Ablesegenauigkeit beträgt etwa $0,5 \text{ mmH}_2\text{O}$. Für Molekulargewichtsbestimmungen ist eine Eichung bis auf 20 cm entsprechend $2,0 \text{ cmH}_2\text{O}$ möglich, die Ablesegenauigkeit beträgt dann unter Berücksichtigung eines geringen Rauschens von etwa $2,5\%$ $0,01 \text{ mmH}_2\text{O}$.

2. Meßvorbereitung

a. Eichung

Die Originalmethode sieht eine Eichung des Manometers mit positivem hydrostatischen Druck vor dem endgültigen Zusammenbau des Meßgerätes vor. Dieses Vorgehen beinhaltet die Gefahr von Fehleichungen:

1. Eichung und Messung erfolgen mit entgegengesetzten Drucken und es ist eine Extrapolation der Eichgeraden notwendig.
2. Eine Kontrolle der Eichung nach Einbau der Membran ist nicht möglich.

Diese Fehlermöglichkeiten wurden durch folgende Eichanordnung eliminiert:

¹⁾: Kompensationsschreiber Linoscript der Fa. Linseis, Selb, BRD

Durch eine Öffnung im Osmometerdeckel ist der Probenraum über einen Polyäthylenschlauch mit einem U-Rohr-Manometer von einem Meter Länge verbunden. Dem Schlauch ist ein T-Stück zwischengeschaltet über das mit einer Injektionsspritze ein Unterdruck erzeugt werden kann, der bei geschlossenem Probenraum direkt am Wasseranometer abgelesen wird. Ein weiterer wichtiger Vorteil dieser Eichanordnung ist, daß die Eichung sowohl ohne als auch mit Membran am meßbereiten Gerät vorgenommen werden kann. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit nach Abschluß einer Meßreihe durch Perforation der Membran in situ die Richtigkeit von Nullpunkt und Verstärkung zu überprüfen.

b. Membraneinbau

Beim Einbau der Membran in das Osmometer ist der Einschluß von Luftbläschen unbedingt zu vermeiden. Gut bewährt es sich, Membran und Dichtungen zuvor langsam in heißes Aqua dest. einzutauchen um die Luft auszutreiben. Die Membranaufgabe wird ebenfalls mit heißem Aqua dest. gespült und Membran und Dichtung werden im warmen Zustand eingebaut. Dabei hat sich die Temperatur nach der Toleranz der verwendeten Membran zu richten.

3. Meßvorgang

Die Meßprobe wird im Wasserbad des Gerätes vortemperiert und mit einer Spritze mit Kanüle durch die Öffnung des Osmometerdeckels direkt auf die Membran aufgebracht. Um eine Verdünnung durch geringe Mengen des auf der Membran befindlichen Lösungsmittels zu vermeiden ist es von Vorteil, einige Tropfen der Probelösung auf die Membran zu bringen und wieder abzusaugen. So dann werden zwischen 4 und 10 Tropfen der Meßprobe aufgetropft, was einem Volumen von etwa 75 bis 180 mm³ entspricht. Es sind gleiche Volumina von Referenz- und Probelösung zu verwenden um hydrostatische Druckunterschiede von Null- und Meßwert zu vermeiden.

Bei Verwendung der Membran Amicon PM 10¹⁾ stellt sich bei Serum-

¹⁾; Membraneigenschaften und Hersteller s.S. 40

messungen innerhalb zwei bis vier Minuten ein konstantes Niveau des KOD ein. Nach einer etwa ein bis zwei Minuten dauernden Spülung mit isotonischer Kochsalzlösung (entsprechend einem Volumen von 10 bis 20 ml) und dem dosierten Auftropfen von vier bis zehn Tropfen der Kochsalzlösung soll die Nulllinie wieder erreicht werden bevor der nächste Meßvorgang beginnen kann. Dieses Vorgehen wird im Gegensatz zur Originalvorschrift empfohlen, da sonst eine Nullliniendrift durch Permeation von Solut oder unvollständige Probenentfernung nicht erfaßt wird.

4. Meßgenauigkeit

Bei Mehrfachbestimmungen ergeben sich je nach Konzentration der Meßprobe und Verstärkungsbereich der Meßanordnung verschiedene prozentuale Abweichungen des Meßwertes: Die größte Meßgenauigkeit erreicht man bei der Messung von Normalseren oder Lösungen von nichtpermeablen Hochpolymeren ähnlicher osmotischer Drucke. Hier beträgt die Abweichung des Endwertes der Messung maximal $\pm 1 \text{ mmH}_2\text{O}$, bei einem KOD-Wert von $40 \text{ cmH}_2\text{O}$ also unter 0,25%. Diese Meßgenauigkeit übertrifft bei weitem alle anderen bei der Untersuchung von Blutseren verwendeten Meßmethoden und ist daher eigentlich nicht notwendig. Sie spricht jedoch für die Zuverlässigkeit von KOD-Messungen mit dem modifizierten Hansen-Osmometer.

Bei KOD-Messungen von Lösungen niedrigerer Konzentration oder gar Molekulargewichtsbestimmungen ist dagegen eine so hohe Meßgenauigkeit erforderlich. Den Zuwachs der prozentualen Abweichung des KOD-Meßwertes mit abnehmender Meßprobenkonzentration zeigen zehn hintereinander folgende Messungen von verdünnten Humanseren: Messungen eines zwanzigfach verdünnten Humanserums mit einer Proteinkonzentration von etwa 4 g/l ergaben einen KOD von $13,3 \pm 0,1 \text{ mmH}_2\text{O}$, entsprechend einer Abweichung von 0,75%. Bei noch weiterer Verdünnung auf etwa 2 g/l ergab sich ein KOD von $5,35 \pm 0,3 \text{ mmH}_2\text{O}$, also eine Abweichung von 5,6% des Meßwertes.

III. Das Problem der Membran

1. Die ideale Membran

Das Zentralproblem jeder osmotischen Messung ist die Auswahl einer geeigneten Membran. Eine ideal "semipermeable" Membran ist nur für das Lösungsmittel, nicht jedoch für den gelösten Stoff durchlässig. Dies erfordert ein genau definiertes Molekularsieb, dessen technische Herstellung bisher nicht möglich ist, in Annäherung aber bei der "Porenmembran" und bei der "Lösungsmembran" vorliegt.

Die ideale Porenmembran weist ein durchgehendes Porensystem auf, das aus dünnen Röhren besteht, deren Durchmesser an jeder Stelle wesentlich größer als die Molekülgröße des verwendeten Lösungsmittels aber sehr viel kleiner als die Molekülgröße des Soluten sind.

Die ideale Lösungsmembran besteht aus einem im Lösungsmittel echt löslichen hochpolymeren Stoff, der ein Gel bildet, in dem das Solvens zwischen den einzelnen Makromolekülen hindurchströmt. Im osmotischen Gleichgewicht befindet sich die Membran im Quellungs-gleichgewicht mit Lösung und Lösungsmittel. Der Transport der Solvensmoleküle erfolgt durch Verdrängungsabsorption, die Solutmoleküle werden durch vollständige sterische Exclusion von der Gelphase reflektiert.

Nach Patat (106) stellen diese beiden Typen von semipermeablen Membranen idealisierte Extremfälle dar, die tatsächlich weder im Aufbau noch in der Wirkungsweise aller gebräuchlichen Membranen vorliegen.

2. Die gebräuchlichen Membranen

Seit Starlings gelatinegetränkter Peritonealmembran wurden für osmotische Meßzwecke viele Membranen entwickelt, die sich in ihren mechanischen, chemischen und Permeabilitäts-Eigenschaften unterscheiden. Die in der Kolloidchemie verwendeten Membranen werden aus synthetischen Hochpolymeren oder auf der Basis von regenerierter Zellulose und deren Estern hergestellt (97, 98). Das Porensystem entsteht entweder durch Bearbeitung (Herauslösen

einer Komponente, Ausgasen von Metallen usw.) oder die molekulare Struktur des Materials selbst wirkt als Siebgitter. Für nichtwässrige oder chemisch aggressive Lösungsmittel finden außerdem folgende Membranmaterialien Verwendung. Polyvinylalkohole, kapillare Ultrafilter wie Glas, Dacron, Nylon, Orlon oder Rayon, Metalle und Metallsalze wie Kalziumsilikat, Kalziumkarbonat, Kupferzyankalium, sowie Graphit, Gel-Kapillarfilter oder fein gestanztes Folienmaterial (21, 53, 140). Eine Übersicht über die spezielle Verwendung und Eigenschaften dieser Membranen gibt E. Patat (106). Wegen der nachfolgend beschriebenen Eigenschaften eignen sich für Messung des KOD von Kolloiden im wässrigen System nur Membranen aus anionischen Hochpolymeren oder aus Zellulose.

a. Aufbau

Membranen aus regenerierter Zellulose sind in Aufbau und Wirkungsweise eine Kombination von Porenmembran und Lösungsmembran. Die Poren sind nicht im Sinne der idealen Porenmembran parallele Röhren sondern besitzen eine Vakuolenstruktur mit durchbrochenen Wandungen. Durch Gelschrumpfung und Deazetylierung der Zellulose bei der Membranherstellung entstehen verschiedene große Risse und trichterförmige Erweiterungen (48). Nach Lippert (79) bildet ein in alle Richtungen verlaufendes leistenförmiges Substanzgerüst im Filterinneren eine schwammartige Struktur. Der Aufbau der Membranen ist über den ganzen Querschnitt gleich, sie sind isotrop. Für die Selektivität der Membranen sind nur die Verengungen im Kanalsystem maßgeblich, wobei jedoch daneben Poren vorliegen, die durchwegs größer als die Solutmoleküle sind. Für die Permeabilität des Soluts ist dieses Porensystem verantwortlich, für die Permeabilität des Solventen zusätzlich die sich im wässrigen System im stabilen Gelzustand befindliche Gerüstsubstanz. Voraussetzung jeder Messung ist, daß die Membran und das Lösungsmittel ein stabiles Gelsystem bilden.

Membranen aus synthetischen Hochpolymeren sind anisotrop, der Aufbau ändert sich mit dem Querschnitt: Eine gleichmäßig verteilte Schwammstruktur von schmalen Substanzleisten schließt an der Oberfläche mit einer engporösen Grenzschicht ab, während die Unterflä-

che nahezu die gleiche Struktur wie das Filterinnere besitzt (108). Die Unterseite und das Innere der Membran setzen einer Permeation von Solut und Solvens nur geringen Widerstand entgegen, die schmale Grenzschrift der Oberfläche bestimmt die selektiven Eigenschaften der Membran.

b. Hydraulische Leitfähigkeit

Zur Charakterisierung des Durchtritts von verschiedenen Lösungsmitteln durch poröse Membranen werden in der Literatur zahlreiche Koeffizienten angegeben, die bei verschiedenen Autoren zum Teil widersprüchliche Verwendung finden. Es sollen hier die gebräuchlichsten Koeffizienten und ihre Definitionen angeführt werden:

Hydraulische Leitfähigkeit

Nach Bjerrum und Manegold (8) errechnet sich die hydraulische Leitfähigkeit einer Membran als das Volumen des Solventen, das in der Zeiteinheit durch einen bestimmten Druck durch eine Membran bestimmter Fläche hindurchgepreßt wird (Gleichung 6).

$$K_H = \frac{Q}{t \cdot F \cdot P} \quad (\text{Gl. 6})$$

K_H : Hydraulische Leitfähigkeit einer Membran für einen bestimmten Solventen $\left[\frac{\text{ml}}{\text{min} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{cmH}_2\text{O}} \right]$

Q : Volumen des durch die Membran gepreßten Solventen [ml]

t : Zeiteinheit in Minuten

F : Fläche der Membran [cm^2]

P : Hydrostatische Druckdifferenz zwischen beiden Seiten der Membran [cmH_2O]

Diese Dimensionen sind aus meßtechnischen Gründen der Osmometrie und Filtration allgemein üblich (106). Will man sie im c-g-s-System angeben, erhält man mit einem entsprechenden Umrechnungsfaktor die Dimension $\left[\frac{\text{cm}^2 \cdot \text{sec}}{\text{g}} \right]$.

Permeabilitätskoeffizient

Für die Verwendung verschiedener Lösungsmittel gibt Patat (106)

charakteristische Permeabilitätskonstanten verschiedener Membranen an (Gleichung 7)

$$K_P = K_H \cdot \rho \cdot g \quad (\text{Gl. 7}).$$

$$K_P: \text{ Permeabilitätskoeffizient } \left[\frac{1}{\text{sec.}} \right]$$

$$\rho : \text{ Dichte des Lösungsmittels } \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right]$$

$$g : \text{ Erdbeschleunigung } \left[\frac{\text{m}}{\text{sec}^2} \right]$$

Durchlässigkeit

Bei Berücksichtigung der Dicke der Membran ist die Durchlässigkeit Ausdruck der Durchtrittsgeschwindigkeit des Solventen durch die Membran (Gleichung 8).

$$K_D = K_P \cdot d \quad (\text{Gl. 8}).$$

$$K_D: \text{ Durchlässigkeit der Membran } \left[\frac{\text{cm}}{\text{sec}} \right]$$

$$d : \text{ Dicke der Membran } [\text{cm}]$$

Darcy-Koeffizient

Nach Renkin und Pappenheimer (11) ist der Darcy-Koeffizient die Strömungskonstante, die den Einfluß der Viskosität auf die Flüssigkeitsströmung durch die Membran ausdrückt (Gleichung 9).

$$K_S = \frac{Q \cdot \eta \cdot d}{t \cdot F \cdot P} \quad (\text{Gl. 9}).$$

$$K_S: \text{ Darcy-Koeffizient oder Strömungskonstante } [\text{cm}^2]$$

$$\eta : \text{ Dynamische Viskosität } \left[\frac{\text{g}}{\text{cm} \cdot \text{sec}} \right] \quad \text{oder} \quad [\text{cP}]$$

Für KOD-Messungen sind Membranen erwünscht, die dem Lösungsmittel Wasser bei der Permeation durch die Membran möglichst wenig Widerstand entgegensetzen: Membranen möglichst hoher hydraulischer Leitfähigkeit ermöglichen die kürzesten Meßzeiten.

c. Selektivität

Die Selektivität einer Membran wird durch ihren Siebeffekt charakterisiert: Welche Molekülgröße kann die Membranporen passieren und welche wird zurückgehalten? Eine Berechnung

der Porengröße in künstlichen Membranen läßt sich nach Renkin und Pappenheimer (110, 111) unter folgenden Annahmen durchführen:

- (1) Die Membran enthält parallele, zylindrische Poren von gleichem Radius, die senkrecht zur Membranoberfläche stehen.
- (2) Durch diese Poren findet eine laminare Strömung statt. Aus dem Poiseuilleschen Gesetz und Gleichung 9 ergibt sich dann ein fiktiver Porenradius (Gleichung 10):

$$r = \sqrt{\frac{8 K_S \cdot F}{F_P}} \quad (\text{Gl. 10})$$

r : fiktiver Porenradius [cm]

F : Membranfläche [cm²]

F_P : Gesamtfläche der Membranporen [cm²]

Die Fläche der Membranporen kann durch Diffusionsmessungen mit markiertem Wasser oder aus der Differenz aus Trocken- und Feuchtwicht der Membran abgeschätzt werden (110, 111).

Theoretisch lassen sich für jede beliebige geometrische Konfiguration von Membranporen in ähnlicher Weise Durchmesser oder Schlitzweiten ermitteln oder für ein beliebiges Verteilungsmuster von unterschiedlichen Porengrößen ein sogenannter effektiver mittlerer Porenradius berechnen (111). Die so ermittelten Porengrößen sagen jedoch wenig über die Selektivität einer Membran aus. Die innere Struktur der gebräuchlichen Membranen und der komplexe Siebmechanismus lassen sich kaum zu einem errechneten effektiven Porenradius in Beziehung setzen. Experimentelle Untersuchungen von Schulz und Kühn (125) ergaben, daß sich aus dem Verhalten einer Membran gegenüber dem Lösungsmittel (hydraulische Leitfähigkeit, Darcy-Koeffizient) nicht auf ihre Selektivität schließen läßt. Es ist nötig das Zusammenwirken der drei Faktoren Solut, Solvens und Selektivität zu betrachten. Die in der Kolloidosmometrie verwendeten Membranen weisen je nach Art ungefähre Selektivitätsgrenzen für Moleküle mit einem Molekulargewicht von 100 000 bis unter 10 000 auf. Moleküle, die in der Größenordnung oberhalb der Selektivitätsgrenze der Membran liegen, die also größer als die engsten Stellen des Porensystems sind, werden von der Membran zurückgehalten. Kleinere Moleküle können die Membran permeieren. Eine echte Semipermeabilität der

Membran, die nur die Lösungsmittelmoleküle permeieren läßt, ist bei einer KOD-Messung nicht erwünscht: Niedermolekulare Anteile würden den KOD von Proteinlösungen verfälschen.

Für KOD-Messungen ist eine vorherige Bestimmung der Selektivität der verwendeten Membran notwendig. Es bieten sich dafür verschiedene empirische Verfahren an:

- (1) Lösungen verschiedener Ureischsubstanzen genau bekannten Molekulargewichtes werden auf Permeation durch die Membran geprüft. Die Permeation des Soluts zeigt sich im zeitlichen Verlauf der osmotischen Messung (125) oder durch chemisch-physikalische Konzentrationsbestimmungen (47).
- (2) Von Lösungen künstlicher oder natürlicher makromolekularer Substanzen geringer Polydispersität werden mit verschiedenen selektiven Membranen osmotische Bestimmungen des mittleren numerischen Molekulargewichtes durchgeführt. Wenn sich bei diesen Messungen immer derselbe Wert ergibt, kann eine Permeation des Soluts ausgeschlossen werden. Die Selektivitätsgrenze der Membranen liegt dann unterhalb der kleinsten Molekülgrößen in der Testsubstanz (47).
- (3) Ultrafiltration von Lösungen makromolekularer Substanzen hoher Polydispersität und physiko-chemische Bestimmung der Molekülgröße der permeierten Anteile. Eine Übersicht über Nachweismethoden findet sich bei Elias et al. (22).

Die Problematik der Bestimmung von Selektivitätsgrenzen von künstlichen und natürlichen Membranen wird später diskutiert.

d. Membranfehler

Die mangelnde Konstanz und Reproduzierbarkeit von hydraulischer Leitfähigkeit und Selektivität kommerzieller Membranen stellen die hauptsächliche Fehlerquelle osmotischer Messungen dar. Die Spezifikation der Membraneigenschaften durch die Hersteller beschränkt sich meist auf ungefähre Angaben.

Durch Absorption von Solutmolekülen an und in der Membran können Meßfehler entstehen. Diese Verstopfung der Membranporen führt zu einer Herabsetzung der hydraulischen Leitfähigkeit, die Meßzeit im Osmometer wird verlängert und man spricht von "Ermüdung" der Membran.

IV. Membran und osmotische Messung

1. Monodisperses System

Die Messung des osmotischen Druckes einer monodispersen Lösung eines makromolekularen Stoffes, dessen Moleküle größer als die größten Poren der ausgesuchten Membran sind liefert die zuverlässigsten Ergebnisse. Solutmoleküle können in die Membran nicht eindringen und dadurch Meßfehler hervorrufen.

2. Polydisperse Systeme

Bei biologischen Flüssigkeiten handelt es sich immer um polydisperse Lösungen mit einer breit gestreuten Molekulargewichtsverteilung der Solute. Im Blutserum besteht normalerweise zwischen den größten niedermolekularen Anteilen mit einem Molekulargewicht von etwa 10 000 und den kleinsten hochmolekularen von etwa 70 000 eine Lücke. Für KOD-Messungen von Seren muß die Selektivität geeigneter Membranen in diesem Bereich sein: Die kleinsten Membranporen müssen größer als die Partikelgröße der niedermolekularen Serumanteile und die größten Membranporen kleiner als die Partikelgröße der hochmolekularen Serumproteine sein. Bei Störungen der normalen Polydispersität des Serums können hochmolekulare Anteile auftreten, die im Größenbereich der Membranporen liegen. Ursache solcher Verschiebungen im Verteilungsmuster der Polydispersität sind zum Beispiel Dysproteinämien, therapeutische Verabreichung künstlicher Kolloide oder Denaturierung der Serumproteine durch extrakorporale Zirkulation bei Herzoperationen.

Bei KOD-Messungen von makromolekularen Lösungen, die permeierfähige Anteile besitzen, liegt ein thermodynamisch irreversibler Vorgang vor. Der gemessene osmotische Druck ist zu allen Zeiten kleiner als der theoretisch zu erwartende. Dafür sind zwei Vorgänge verantwortlich:

- a. Durch die Diffusion von permeierfähigen Molekülen durch die Membran gehen potentiell osmotisch wirksame Teilchen der Meßlösung verloren und bewirken einen osmotischen Effekt auf der Lösungsmittelseite. Diese Diffusion gehorcht dem Fickschen Gesetz und kann nach experimentellen Untersuchungen von Ritscher

und Elias (116) durch Anwendung hydrostatischer Drucke nicht wesentlich beeinflußt werden.

- b. Nach einer Theorie von A.J. Stavermann (132) tragen permeierfähige, aber noch nicht permeierte Moleküle einen geringeren Anteil zum osmotischen Druck bei als vollständig reflektierte Moleküle.

Experimentelle Untersuchungen ergaben, daß der beobachtete KOD (π_{exp}) niedriger als der theoretisch zu erwartende KOD (π_{th}) ist (1, 2, 116, 132) (Gleichung 11):

$$\pi_{\text{exp}} = \pi_{\text{th}} \cdot \sigma \quad (\text{Gl. 11}).$$

π_{exp} : Experimentell bestimmter KOD [cmH_2O], proportional zur Anzahl der durch die Membran zurückgehaltenen Moleküle.

π_{th} : Theoretisch erwarteter KOD [cmH_2O] bei Berücksichtigung der Solutmoleküle, die schon zum Zeitpunkt der Messung die Membran permeiert haben.

σ : Stavermannscher Reflektionskoeffizient, konzentrationsabhängig und systemspezifisch für Membran und Solut.

$\sigma = 0$ für nichtselektive Membranen,

$\sigma = 1$ für "ideal" semipermeable Membranen.

Durbin (20) gibt eine Methode an, den Stavermannschen Koeffizienten für monodisperse Systeme aus dem Verhältnis vom Radius der Solutmoleküle zum effektiven Porenradius der Membran zu berechnen. Nach Hoffmann und Unbehend (51) läßt sich die Diffusion molekular einheitlicher Stoffe durch gequollene Zellophanmembranen osmometrisch messen und die Abweichung vom theoretischen osmotischen Druck zu den Diffusionsgeschwindigkeiten von Lösungsmittel und gelöstem Stoff in Beziehung setzen. Der Diffusionswiderstand setzt sich nach Renkin (110) aus der sterischen Behinderung der Moleküle am Poreneingang und aus dem Reibungswiderstand innerhalb der Membran zusammen.

Der experimentell bestimmte KOD (π_{exp}) ist auch im Falle der Extrapolation auf die Meßzeit Null ($\pi_{\text{exp},0}$), in der noch keine permeierfähigen Solutmoleküle die Membran passiert haben können, nicht

identisch mit dem theoretisch erwarteten KOD (Π_{th}). Der Anteil eines permeierfähigen Soluts am KOD einer Lösung nimmt proportional seiner Permeabilität ab. Stavermann nennt das Verhältnis aus den Permeabilitätskoeffizienten einer Membran für Solut und Solvens den Selektionskoeffizienten (S). Für monodispers gelöste Stoffe kann (S) aus Permeabilitätsmessungen der Membran erhalten werden, polydisperse Systeme besitzen jedoch Komponenten mit Selektionskoeffizienten zwischen Null und Unendlich.

Der Unterschied zwischen theoretisch berechnetem und experimentell bestimmten KOD ergibt sich nach Stavermann also aus dem zu Grunde gelegten thermodynamischen Gleichgewicht, das aber bei polydispersen Systemen mit permeablen Anteilen nicht vorliegt.

D. ERGEBNISSE

I. Membranuntersuchungen

1. Membranmaterial

Folgende Membranen wurden auf Verwendbarkeit zur KOD-Messung im Hansen-Osmometer getestet:

Membrantypen SM 11733, SM 11736, SM 11739, SM 12133,
SM 12136¹⁾

Membrantypen AC 61, AC 62, AC 63, EL 41 EL 42²⁾

Diese Membranen sind Zelluloseazetatmembranen mit der für diese Art typischen Vakuolenstruktur mit durchbrochenen Wandungen. Sie bilden mit Wasser als Solvens ein stabiles Gelsystem, das zusammen mit den Poren ihre Selektivität bestimmt. Über den gesamten Membranquerschnitt sind sie isotrop gebaut und nicht elektrisch geladen.

Membrantypen UM 10, PM 10, UM 2³⁾

Diese Membranen sind nach Herstellerangaben anisotrop "gehäutete Molekularfilter" aus nicht näher definierten synthetischen Hochpolymeren. Sie setzen sich aus einer oberflächlichen, engporigen, die Selektivität bestimmenden Membranhaut und aus einer weitporigen, die mechanischen Eigenschaften bestimmenden Gerüstsubstanz zusammen. Sie besitzen eine biologisch inerte, nichtionische Grundstruktur.

Bei Voruntersuchungen der hydraulischen Leitfähigkeit (Methode s.S. 42) zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen der Gruppe der anisotropen Membranen und der Gruppe der isotropen Membranen.

1) Hersteller: Fa. Sartorius Membranfilter GmbH
34 Göttingen, Postfach 142

2) Hersteller: Fa. Schleicher und Schüll
3354 Dassel/Kr. Einbeck

3) Hersteller: Fa. Amicon Filter NV.
Oosterhout, Holland

Unter den isotropen Membranen zeigten sich nur geringe Unterschiede der vergleichbaren Membrantypen. Für genauere Membranuntersuchungen konnten deshalb stellvertretend für alle Zellulosemembranen die Typen SM 11733, SM 11736 und SM 11739 gewählt werden.

2. Mechanische Eigenschaften

Die Membrantypen UM 2, UM 10, SM 12133, SM 12136 erlaubten wegen ihrer Dicke kein faltenfreies Aufpressen auf die gewölbte Membranunterlage der Meßkammer. Die entstandenen Falten hoben sich von der Unterlage ab und vergrößerten das Volumen unter der Membran. Der so erzeugte Balloneffekt verlängerte die Meßzeit um mehrere Minuten. Da mit den Membrantypen PM 10, SM 11733 und SM 11736 dünnere, in der Selektivität nach Herstellerangaben aber entsprechende Membranen zur Verfügung standen, konnte auf weitere Untersuchungen der mechanisch ungeeigneten Membranen verzichtet werden.

Alle übrigen Membranen waren ohne Schwierigkeiten einzubauen und zeigten bei KOD-Messungen keine Anzeichen eines Balloneffektes.

3. Hydraulische Leitfähigkeit

Es wurden die Membrantypen PM 10, SM 11733, SM 11736, SM 11739 auf ihre hydraulische Leitfähigkeit für Wasser geprüft. Dazu wurden sie im Hansen-Osmometer einem rechteckförmigen, negativen hydrostatischen Druck von 40 cmH₂O ausgesetzt: Der Raum zwischen Membran und Plexiglasdeckel war luftblasenfrei mit destilliertem Wasser gefüllt und über einen Schlauch mit einem Dreiweghahn an eine Wassersäule angegebener Höhe angeschlossen.

Abhängig von der hydraulischen Leitfähigkeit der getesteten Membranen stellte sich nach verschiedener Zeit das hydrostatische Gleichgewicht ein. Dabei strömten entsprechend der Volumenelastizität des elektronischen Manometers etwa $2 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3$ Wasser durch die Membranporen (Tab. I).

TABELLE I

ZEITLICHER VERLAUF DER EINSTELLUNG DES HYDROSTATISCHEN GLEICHGEWICHES IM OSMOMETER NACH EINEM RECHTECKFÖRMIGEN DRUCKSPRUNG FÜR VIER MEMBRANTYPEN

Typ	P M 10		11733		11736		11739	
	50%	80%	50%	80%	50%	80%	50%	80%
Nr.								
1	0,32	0,50	1,86	4,56	0,34	3,48	3,12	7,30
2	0,36	0,54	1,80	4,62	3,24	10,80	8,40	22,90
3	0,30	0,54	1,80	4,32	4,20	12,50	9,60	24,90
4	0,36	0,48	0,72	2,76	0,36	4,80	4,66	19,20
5	0,361	0,54	1,56	4,14	2,82	9,06	6,00	15,60
$\bar{x}$	0,34	0,52	1,548	4,08	2,192	8,128	6,756	17,98
s	0,028	0,028	0,477	0,762	1,754	3,867	2,48	6,982
$s\bar{x}$	0,013	0,013	0,213	0,341	0,785	1,73	1,109	3,109

Zeit (s) bis zum Erreichen des 50% und 80% Wertes des hydrostatischen Gleichgewichtes nach einem rechteckförmigen Drucksprung von 40 cmH₂O für fünf Membranen einer Charge. Dargestellt sind Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichung (s) und mittlerer Fehler des Mittelwertes ($s\bar{x}$).

Wie Tab. I zeigt, besitzt die Membran PM 10 die größte hydraulische Leitfähigkeit. Die Membranen der SM-Serie weisen abnehmende hydraulische Leitfähigkeit mit abnehmendem mittleren Porendurchmesser (s. Herstellerangaben, Tab. II) auf.

Eine Fehlerhaftigkeit infolge Makroporen wurde durch vorherige KOD-Messungen einer Standardalbuminlösung ausgeschlossen. Dabei schieden bei insgesamt 50 untersuchten Membranen von den Membrantypen PM 10 keine, von der SM 11733 etwa 20%, der SM 11736 etwa 30% und von der SM 11739 etwa 70% der Membranen wegen Makroporen oder bis zu hundertfach geringerer Hydraulischer Leitfähigkeit aus.

Messungen der hydraulischen Leitfähigkeit wurden an jeweils vorgeprüften fünf Membranen der gleichen Charge durchgeführt. Als relatives Maß der hydraulischen Leitfähigkeit jeder Membran wurde die Zeit gemessen, die für das Erreichen des 50%- und des 80%-Wertes vom angelegten rechteckigen Drucksprung benötigt wurde (Tab. I). Es zeigte sich, daß die Membranen der Type PM 10 in ihrer hydraulischen Leitfähigkeit nur eine geringe Streubreite aufweisen, die Membranen der SM-Reihe jedoch sehr stark schwankende Werte liefern.

Für die Auswertung der Meßergebnisse und die Berechnung der hydraulischen Leitfähigkeit kann aus meßtechnischen Gründen Proportionalität zwischen der Volumenverschiebung durch die Membran und gemessenem hydrostatischen Druck im Osmometer angenommen werden. Aus der Volumenelastizität des elektronischen Manometers und Gleichung 6 läßt sich dann unter Verwendung der Mittelwerte der Zeitmessung die hydraulische Leitfähigkeit (K_H) der Membranen für Wasser berechnen (Tab. II). Bis zum Erreichen des 50%-Wertes des hydrostatischen Gleichgewichtes über den Membranen konnte vereinfachend eine lineare Beziehung von Druckabfall und Meßzeit angenommen werden.

TABELLE II

EXPERIMENTELL BESTIMMTE HYDRAULISCHE LEITFÄHIGKEIT VIER VERSCHIEDENER
MEMBRANTYPEN IM VERGLEICH ZUR HERSTELLERANGABE

Membrantyp	$K_H(\text{exp}) \left[\frac{\text{ml}}{\text{min} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{cmH}_2\text{O}} \right]$	$K_H(\text{Herst}) \left[\frac{\text{ml}}{\text{min} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{cmH}_2\text{O}} \right]$	D [mp]
PM 10	18 · 10 ⁻⁶	70 · 10 ⁻⁶	-
SM 11733	4 · 10 ⁻⁶	1 - 3 · 10 ⁻⁶	10 - 20
SM 11736	2,8 · 10 ⁻⁶	0,25 - 1,0 · 10 ⁻⁶	5 - 10
SM 11739	0,9 · 10 ⁻⁶	0,12 - 0,25 · 10 ⁻⁶	5

$K_H(\text{exp})$: Berechnete hydraulische Leitfähigkeit nach Mittelwerten aus Tabelle I.

$K_H(\text{Herst})$: Herstellerangaben, Dimensionen umgerechnet.

D (Herst): Membranporendurchmesser nach Angaben der Hersteller (1 μm = 1 nm = 10 $\text{\AA}$)

4. Selektivität

Zur groben Abschätzung der Selektivität der vier Membrantypen wurden KOD-Messungen von Lösungen folgender Substanzen durchgeführt:

Hämoglobin¹⁾ (MG 64500), Rinderalbumin²⁾ (MG 70000), Ovalbumin³⁾ (MG 45000), Chymotrypsinogen A⁴⁾ (MG 24500) und Myoglobin⁵⁾ (17800).

Der Nachweis permeierender Substanz erfolgte durch die Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der osmotischen Messung (s.S. 48). Alle verwendeten Membranen erwiesen sich als nicht permeabel für Hämoglobin, Rinderalbumin und Ovalbumin. Für Chymotrypsinogen A waren die Membranen der Typen SM 11736 und SM 11739 undurchlässig, für Myoglobin waren jedoch alle Membranen permeabel. Diese Ergebnisse lassen auf "Selektivitätsgrenzen" in folgenden Bereichen schließen (Tab. III):

Tab. III:

SELEKTIVITÄT VIER VERSCHIEDENER MEMBRANTYPEN:

Membrantyp	Selektivitätsgrenze (MG-Bereich)	
SM 11736	17 800	24 500
SM 11739	17 800	24 500
PM 10	24 500	45 000
SM 11733	45 000	64 500

<MG<

Die Selektivitätsgrenze liegt im Molekülgrößenbereich zwischen permeabler und nichtpermeabler Substanz des angegebenen Molekulargewichts (MG).

¹⁾ Hämoglobin vom Rind, 2xkrist. reinst der Fa. SERVA Feinbiochemica GmbH. u. Co., Heidelberg

²⁾ Albumin aus Rinderserum, krist. reinst der Fa. SERVA

³⁾ Albumin aus Hühnerei, 5 x krist. reinst der Fa. SERVA

⁴⁾ Chymotrypsinigen A vom Rind 6 x krist. reinst der Fa. SERVA

⁵⁾ Myoglobin vom Pferd reinst der Fa. SERVA

Die Permeabilität für hochmolekulare Substanzen nimmt also in der Reihenfolge der Membrantypen SM 11739, 11736, PM 10, SM 11733 zu. Auffallend an diesem Ergebnis ist, daß die "Selektivitätsgrenze" der Membrantype PM 10 in einem bedeutend höheren Bereich liegt als vom Hersteller mit MG 10000 angegeben wird. Vorausgesetzt, die vorschriftsmäßige Reinheit der Meßpräparate traf zu, zeigt sich eine um vieles höhere Empfindlichkeit des KOD-Meßsystems im Vergleich zu Ultrafiltrationsmethoden zum Nachweis der Membranpermeabilität.

Die Selektivität einer Membran spielt für Messungen des KOD von polydispersen Lösungen dann eine entscheidende Rolle, wenn Lösungsanteile vorhanden sind, die in ihrer Molekülgröße im Bereich der Selektivitätsgrenze liegen: Vier wässrige polydisperse Lösungen mit zunehmend größerem Anteil an Molekülen unter einem Molekulargewicht von 25000 wurden mit verschiedenen Membrantypen gemessen (Tab. IV). Das verwendete Albumin¹⁾ enthielt geringfügige Anteile eines Molekulargewichts von 25000, die lediglich immunoelektrophoretisch nachweisbar waren. Während die Meßwerte der Membrantype PM 10, SM 11733 und SM 11736 innerhalb der einfachen Standardabweichung liegen, erfaßt die engporige Membran SM 11739 den niedermolekularen Anteil und liefert einen höheren KOD. Bei den polydispersen Blutersatzmitteln Dextran 60²⁾, Dextran 40³⁾ und Gelatine⁴⁾ wurden mit abnehmender Porengröße, entsprechend dem Ergebnis der "Selektivitätsgrenzen"-Untersuchungen der Membrantypen, zunehmend höhere KODs gemessen. Die Differenz von höchstem zum niedrigsten Wert beträgt für Dextran²⁾ etwa 10%, für Dextran 40³⁾ etwa 20%. Für die besonders stark polydisperse Gelatine⁴⁾, die nach Kristi Granath et al. (34) etwa 50% Gewichtsanteile mit einem MG von 20 000 und

1) Human-Albumin Behringwerke der Fa. Behringwerke AG, Marburg-Lahn

2) Macrodex^R, 6% der Fa. Knoll AG, Ludwigshafen,

3) Rheomacrodex^R 10% der Fa. Knoll AG, Ludwigshafen

4) Gelifundol^R der Fa. BIOTEST-Serum-Institut GmbH., Frankfurt

darunter und 15% Gewichtsanteile mit einem MG über 52 000 enthält, unterscheiden sich die Mittelwerte um mehr als den Faktor 4.

Die Standardabweichung der Meßwerte in Tab. IV wird zunehmend größer, je höher der Anteil der Moleküle ist, die in ihrem Molekulargewicht in der Nähe der Selektivitätsgrenze der Membran liegen.

Aus diesen Untersuchungen muß man den Schluß ziehen, daß reproduzierbare Messungen an polydispersen makromolekularen Lösungen nur dann erzielt werden können, wenn eine Permeation von Anteilen des Soluts durch die Membran sicher ausgeschlossen werden kann.

Tab. IV:

ERGEBNISSE VON KOD-MESSUNGEN VERSCHIEDENER MAKRO-MOLEKULARER LÖSUNGEN ZUNEHMENDER POLYDISPERSITÄT MIT VERSCHIEDEN SELEKTIVEN MEMBRANEN:

	Amicon PM 10	SM 117 33	SM 117 36	SM 117 39
ALBUMIN 6,3 %	37,8 ± 0,2	37,3 ± 0,4	38,2 ± 0,4	41,3 ± 0,8
DEXTRAN 60 6,0 %	91,6 ± 1,9	93,0 ± 1,8	99,4 ± 2,0	103,1 ± 1,8
DEXTRAN 40 5,0 %	69,2 ± 5,8	71,6 ± 5,8	83,3 ± 2,8	87,2 ± 2,1
GELATINE 3,5 %	36,2 ± 4,5	17,4 ± 1,7	43,7 ± 4,0	71,0 ± 13,9

Jeweils fünf Membranen einer Charge und Type wurden verwendet.

Angewendet sind die Mittelwerte des KOD (cm^3/h_2) und die Standardabweichungen. Die Polydispersität der Lösungen nimmt von oben nach unten zu (Einzelheiten im Text).

II. Der zeitliche Verlauf der osmotischen Messung

Die Beobachtung des Einstellvorganges im Osmometer erlaubt eine Beurteilung sowohl des Meßsystems als auch des Systems Membran-Makromolekulare Lösung.

1. Allgemeine Kriterien

Die Messung des osmotischen Druckes eines nicht permeierfähigen Solut ergibt beim modifizierten Hansen-Osmometer eine typische Einstellkurve, wie sie die mittlere Kurve der abgebildeten Originalregistrierungen zeigt (Abb. 5):

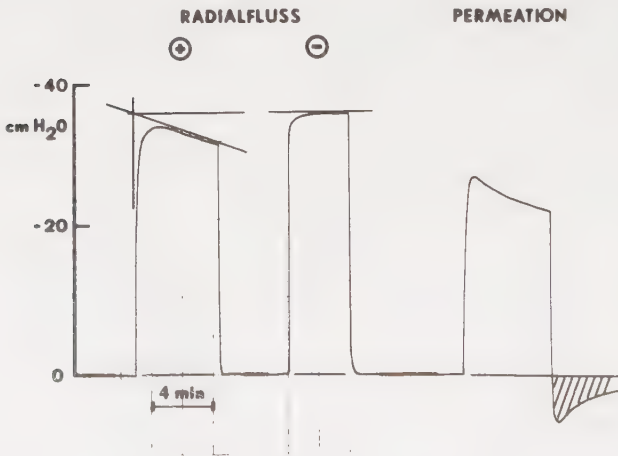


Abb. 5:
KOD-Meßkurve
bei Radialfluß,
idealer Messung
und Permeation.
Abszisse: Zeit
(min)
Ordinate: KOD
(cmH₂O)
(Originalregi-
strierungen)

Zwei Minuten nach Aufbringen einer Albuminlösung ist das osmotische Gleichgewicht erreicht, es stellt sich ein Niveau ein, das über Stunden unverändert bleibt. Beim Entfernen der Lösung und Spülen mit dem Lösungsmittel stellt sich innerhalb einer halben Minute wieder die Nulllinie von oben her ein. Erfolgt keine Einstellung eines Niveaus und fällt die Kurve kontinuierlich ab, kommen als Ursache zwei Vorgänge in Frage:

a. Undichtigkeit des Meßsystems

Dies ist in der linken Meßkurve (Abb. 5) der Fall. Die Membran PM 10 ist ohne die beschriebene Zusatzdichtung eingespannt und erlaubt daher einen Radialfluß von weniger als $0,2 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^3/\text{min.}$ Andere Osmometer leiden unter demselben Fehler, jedoch läßt er sich bei unserer Methode durch die hohe Empfindlichkeit des Druckmeßsystems erfassen. Nach Entfernen der Meßlösung wird sofort die Nulllinie erreicht.

b. Solut permeiert die Membran

Bei Verwendung einer fehlerhaften, mit Makroporen ausgestatteten Membran oder einer Lösung von Makromolekülen, deren Größen im Porengrößenbereich ("Selektivitätsgrenze") der Membran liegen, diffundieren Makromoleküle durch die Membran. Es kommt ebenfalls zu einem abfallenden Verlauf der KOD-Meßkurve (Abb. 5, rechte Kurve). Eine Differenzierung gegenüber der Meßkurve bei einem Leck wird beim Entfernen der Meßprobe und Spülen mit Lösungsmittel möglich: Die permeierten Makromoleküle sind unter der Membran osmotisch wirksam und es wird ein positiver Druck registriert. Die Nulllinie wird erst nach Entfernung aller permeierten Moleküle durch längeres Spülen mit Lösungsmittel erreicht.

2. Einstellvorgang bei Polydispersen Systemen

a. Molekülgröße des Soluts außerhalb der Selektivitätsgrenze der Membran

Befinden sich in der Meßlösung Moleküle, die wesentlich kleiner oder größer als die Membranporen sind, ergibt sich jeweils ein charakteristischer Verlauf des Einstellvorganges im Osmometer (Abb. 6).

Die linke Kurve in Abb. 6 ist die Originalregistrierung der KOD-Messung eines proteinfreien Serumfiltrates: Die niedermolekularen Anteile (Elektrolyte, Kohlehydrate, Fette etc.) führen zu einem initialen osmotischen Effekt und diffundieren dann durch die Membran bis zur Gleichgewichtseinstellung, sichtbar in Form der Nulllinie. Dieser Diffusionsvorgang gehorcht dem Fickschen Gesetz, der Diffusionskoeffizient

ist vom Verhältnis der Membranporengröße zur Molekülgröße und damit indirekt vom Verhältnis der Permeabilitätskoeffizienten für Solut und Solvens (Stavermannscher Selektionskoeffizient) abhängig. Je kleiner die permeierfähigen Moleküle sind, desto schneller wird das Diffusionsgleichgewicht und damit die Nulllinie erreicht. Beim Wechsel auf das Lösungsmittel erfolgt eine Umkehr des osmotischen Effektes und ebenfalls Rückkehr zur Nulllinie.

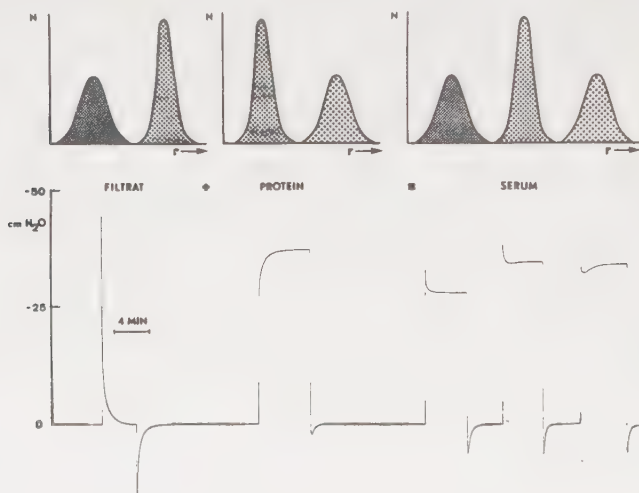


Abb. 6: Einstellungsvorgang bei polydispersen Systemen:

Bild oben: Schematische Darstellung des Verhältnisses von Molekülradien zu Porenradien (r), in Annäherung als Binomialverteilung symbolisiert. Alle Moleküle (N) sind kleiner (feiner Raster) oder größer (grober Raster) als die Membranporen (mittelfeiner Raster)

Bild unten: Obigem Schema zugeordnete Originalmeßkurven eines proteinfreien Serumfiltrates (links), einer reinen Albuminlösung (mitte) und verschiedener normaler Humanserum (rechts).

Bei Messung einer reinen Proteinlösung (Abb. 6, mitte) stellt sich nach etwa vier Minuten ein stabiler KOD-Meßwert ein: Hier sind alle Moleküle größer als die Membranporen.

Messungen des KOD von normalen Humanseren zeigen typische Einstellungskurven (Abb. 6, rechts): Es überlagern sich die Einstellungsvorgänge der permeierenden und nichtpermeierenden Serumanteile. So entstehen je nach anteilmäßiger Zusammensetzung der Humanseren Superpositionskurven aus der Meßkurve links und mitte. Zu beachten ist besonders, daß in allen Fällen innerhalb von zwei bis vier Minuten ein stabiles osmotisches Gleichgewicht eingestellt ist und beim Wechsel von Probe auf Lösungsmittel (isotonische Kochsalzlösung) nach kurzer Zeit die Nulllinie wieder erreicht ist. Die allgemeinen Kriterien der internen Fehlerkontrolle des Meßsystems und der Membran sind also erfüllt.

b. Molekülgröße des Solut im Bereich
der Selektivitätsgrenze der Membran

Für Seren normaler Zusammensetzung liefern die Membranen SM 11733, SM 11736 und SM 11739 ähnliche KOD-Meßwerte. Bei hoch polydispersen Lösungen werden jedoch verschiedenen große Anteile aus der Molekulargewichtsverteilung erfaßt und daher weit divergierende Werte gemessen. Meßkurven des KOD einer 3,5% Gelatinelösung¹⁾ mit verschiedenen selektiven Membranen zeigen zwei Effekte (Abb. 7):

- (1) Kontinuierlicher Abfall des KOD durch eine Diffusion der permeierfähigen Anteile der Lösung durch die Membran.
- (2) Die Extrapolation der drei Meßkurven auf den Zeitpunkt Null führt zu verschiedenen KOD-Werten.

Der Vorgang der Diffusion ist aus den Originalregistrierungen ersichtlich: Alle drei Kurven weisen die für Permeation typischen Kriterien des Kurvenverlaufs auf. Mit zunehmender Zeit diffundieren immer mehr Anteile der Lösung durch die Membran, es kommt jedoch in der Meßzeit nicht zur Ausbildung eines Diffusionsgleichgewichtes. Die Meßkurven nähern sich einem Niveau, das nur unter Ein-

¹⁾ Gelifundol^R der Fa. Biotest-Serum-Institut GmbH, Frankfurt

schränkung die "Abschätzung" eines Endwertes erlaubt. So wurde selbst bei über zwei Stunden dauernden Messung noch ein abfallender Verlauf der Meßkurve gefunden.

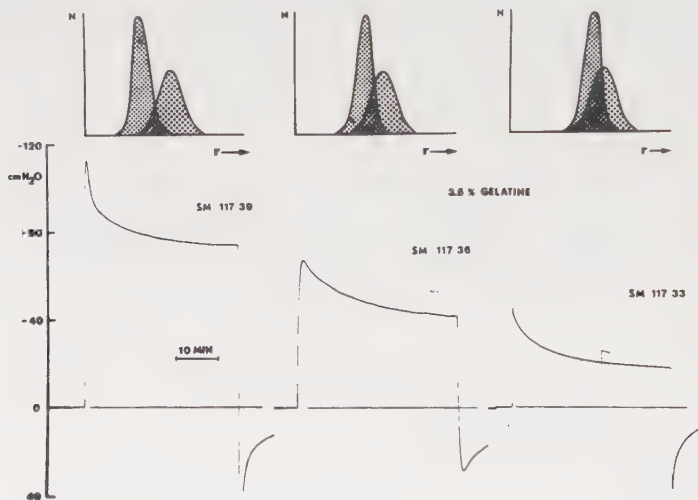


Abb. 7: Einstellvorgang bei polydispersen Systemen.

Bild oben: Schematische Darstellung des Verhältnisses von Molekülradien zu Porenradien (r) verschieden selektiver Membrantypen (in Annäherung als Binomialverteilung symbolisiert). Eine Gelatinelösung beinhaltet Molekül (N) (großer Raster), deren Größe im Bereich der Membranporen liegen. Abhängig von der Selektivität werden verschieden große Lösungsanteile zurückgehalten (Überschneidungsbereich).

Bilden unten: Originalmeßkurve einer 3,5% Gelatinelösung bei Verwendung drei verschieden selektiver Membrantypen (SM 11739, SM 11736, SM 11733).

III. Physikalisch-chemische Untersuchungen

1. Korrelation von Konzentration und osmotischem Druck von Kolloidlösungen

a. Makromolekulare Lösungen als Monokomponenten-System

Zur Untersuchung des im Sinne von van't Hoff nichtidealen Lösungsverhaltens makromolekularer Lösungen wurden an Verdünnungsreihen mehrerer reiner Substanzen osmotische Druckmessungen durchgeführt (Abb. 8):

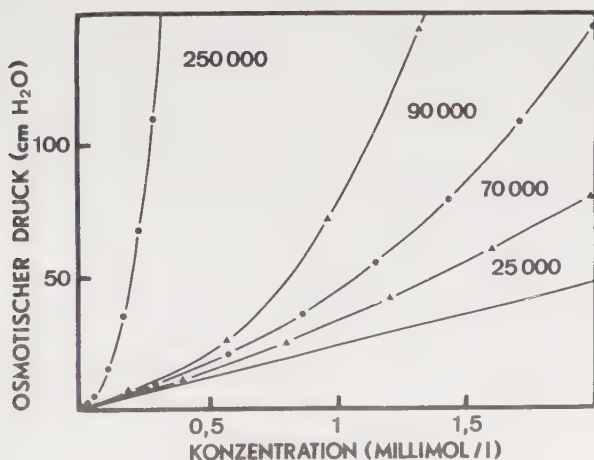


Abb. 8: Korrelation von molarer Konzentration und osmotischem Druck von Lösungen folgender Substanzen:

Dextran 40 ($\bar{M}_n \sim 25\,000$; $\bar{M}_w \sim 40\,000$)¹⁾

Humanalbumin ($\bar{M}_n = \bar{M}_w = 70\,000$)²⁾

Ficoll ($\bar{M}_n \sim 90\,000$)³⁾; Dextran 500 ($\bar{M}_n \sim 250\,000$)⁴⁾

Abszisse: molare Konzentration (mMol/l)

Ordinate: osmotischer Druck (cmH₂O)

Die Angaben für $\bar{M}_w$ stammen aus der Literatur (34) die Werte für $\bar{M}_n$ aus eigenen Messungen.

Die unterste Kurve stellt die lineare Beziehung nach van't Hoff dar; Die lineare Extrapolation für eine einmolare Lösung ergäbe 24 atm (= $24 \cdot 10^3$ cmH₂O).

1) Rheomacrodex^R der Fa. Knoll AG, Ludwigshafen

2) Human-Albumin der Fa. Behringwerke AG, Marburg/Lahn

3) Ficoll der Fa. Pharmacia AB, Uppsala, Schweden

4) Fa. Knoll A.G., Ludwigshafen

Mit zunehmendem mittleren Molekulargewicht zeigen die Lösungen zunehmend größer werdende Abweichungen von der idealen linearen Beziehung nach dem van't Hoff'schen Gesetz. Die molare Konzentrationsangabe wurde gewählt um den Einfluß der Molekülgröße auf die Aktivität des Lösungsmittels Wasser darzustellen.

Wird der osmotische Druck nicht in Relation zur Anzahl der Teilchen (Molarität) sondern zur Gewichtskonzentration aufgetragen, zeigt sich, daß Lösungen von Substanzen sehr hohen Molekulargewichts (Dextran 500¹⁾, Hyaluronsäure) in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen einen geringeren osmotischen Effekt ausüben als Albumin, im Konzentrationsbereich von 1 - 1,5g% jedoch schon höher wirksam sind (Abb.9). Die intermolekulare Wechselwirkung führt bei nur wenig höherer Konzentration zu einem äußerst steilen Anstieg des Kolloidosmotischen Druckes.

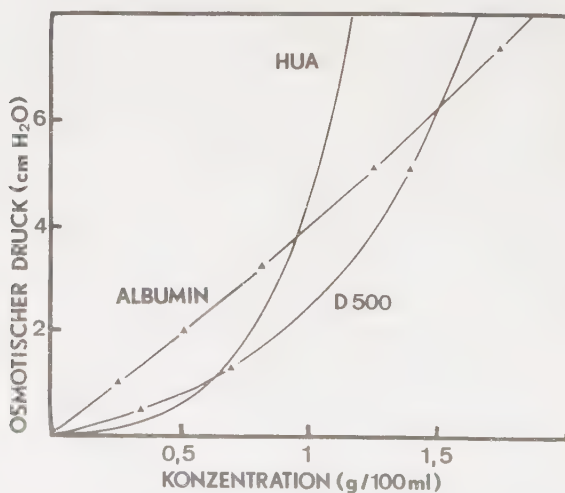


Abb. 9: Korrelation von Gewichtskonzentration und osmotischem Druck von Lösungen folgender Substanzen:

Dextran 500 000 (D 500)¹⁾

Hyaluronsäure (HUA)

Humanalbumin²⁾

Abszisse: Gewichtskonzentration (g/100 ml)

Ordinate: osmotischer Druck (cmH₂O)

Die Werte für Hyaluronsäure sind von Preston et al. (107) übernommen.

1) Fa. Hoechst AG, Ludwigshafen

2) Fa. Behringwerke AG, Marburg

Im physiologischen Konzentrationsbereich von Humanalbumin (0 - 60 g/l)¹⁾ ließ sich experimentell die in Abb. 10 dargestellte Korrelation zum KOD feststellen.

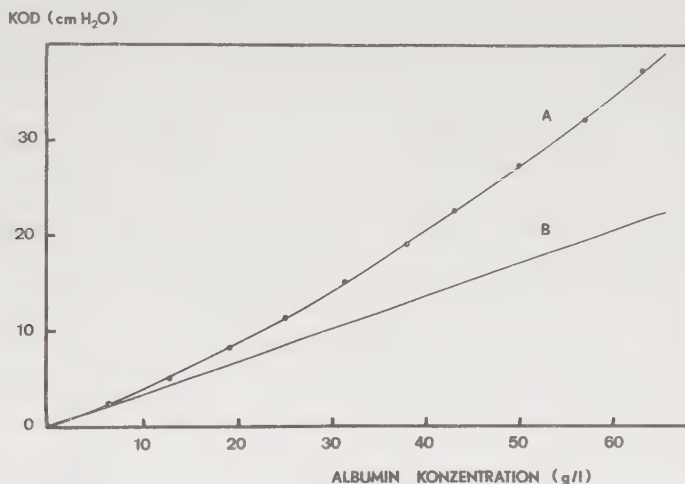


Abb. 10: Korrelation von Konzentration¹⁾ und KOD einer Humanalbumin-Kochsalzlösung (pH 6,7²⁾, Temp. 37°C).

Abszisse: Konzentration von Humanalbumin (g/l)

Kurve A: Berechnete Regression für Humanalbumin
 $= 0,3735 c + 0,0034 c^2$ (cmH₂O).

Die angegebenen Punkte sind der Berechnung zugrunde gelegte Meßpunkte.

Kurve B: Berechnete Regression nach van't Hoff für eine reine Humanalbuminlösung,
 $= 0,3753 c$ (cmH₂O).

¹⁾ Konzentrationsbestimmung nach der Biuret Methode und einer Verdünnungsreihe

²⁾ Astrup Micro Equipment, Radiometer, Copenhagen, Denmark

b. Makromolekulare Lösungen als Mehr-Komponenten-System

Besitzt eine polydisperse makromolekulare Lösung Anteile sehr hohen Molekulargewichts, ist schon bei niederen Konzentrationen der Sterische Exklusionseffekt feststellbar. So zeigt eine Lösung von Albumin und Agar¹⁾ einen höheren Gesamt-KOD als die Summation des KOD der separaten Lösungen ergäbe (Abb. 11):

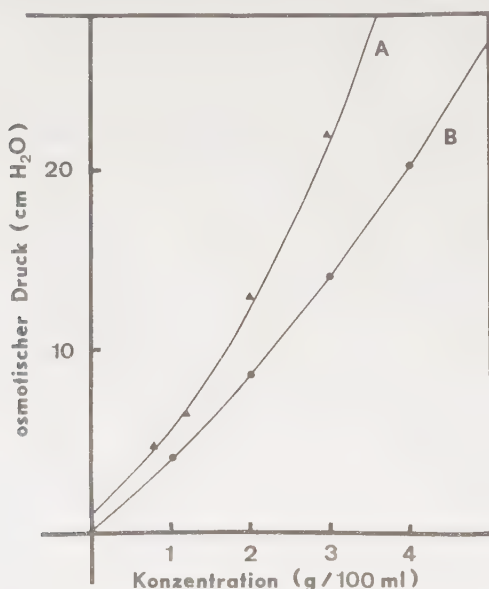


Abb. 11: Sterischer Exklusionseffekt

Erhöhung des KOD von Albuminlösungen verschiedener Konzentration durch Beimengung von 0,25 g% Agar-Lösung.

Abszisse: Konzentration der Albuminlösung (g/100 ml)

Ordinate: Kolloidosmotischer Druck (cmH₂O)

Kurve A: Albumin in 0,25 g% Agar-Lösung

Kurve B: Reine Albuminlösung

Der Sterische Exklusionseffekt wird bemerkenswerterweise schon bei "kleinen" Mengen Albumin bemerkbar und wirkt sich deutlich aus. Die volle Bedeutung dieses Phänomens wird später diskutiert.

¹⁾ Reinagar der Fa. Behringwerke AG, Marburg-Lahn

2. Osmotische Molekulargewichtsbestimmungen

Für makromolekulare Substanzen, die keine membranpermeablen Anteile besitzen, liefert das osmometrische Verfahren der Molekulargewichtsbestimmung eine Genauigkeit, die allen anderen Methoden überlegen ist (z.B. Diffusionsbestimmungen, Streulichtmessungen, Messungen der Sedimentationsgeschwindigkeit in der Ultrazentrifuge, Polymerisationsgradbestimmungen, Messungen der Gefrierpunktserniedrigung oder Siedepunktserhöhung) (17). Der MG-Bereich, für den dieses Verfahren geeignet ist, wird von der Selektivität der Membran nach unten (MG 20 000) und dem zunehmend größer werdenden sterischen Exklusionseffekt nach oben (MG 200 000) begrenzt.

Voraussetzung des im folgenden geschilderten Verfahrens ist die Gültigkeit des van't Hoffschen Gesetzes im Bereich sehr hoher Verdünnungen, wo direkte Proportionalität von KOD und Konzentration angenommen werden darf. Folgende Schritte werden durchgeführt:

- (1) Bestimmung des KOD (Π) von Lösungen der zu untersuchenden Substanz unterschiedlicher und möglichst geringer Konzentration (C).
- (2) Graphische Extrapolation des "reduzierten" osmotischen Drucks ($\frac{\Pi}{C}$) auf die Konzentration Null aus der Regressionsgeraden.
- (3) Einsetzen des ermittelten Wertes ($\frac{\Pi}{C}$)_{C→0} in Gleichung 12:

$$MG = \frac{R \cdot T}{\left(\frac{\Pi}{C}\right)_{C \rightarrow 0}} \quad (\text{Gl. 12})$$

MG: Molekulargewicht

R : Allgemeine Gaskonstante 8,314 $\left[\frac{\text{Joule}}{\text{mol} \cdot \text{grad} \cdot \text{K}} \right]$
 oder 84,75 · 10³ $\left[\frac{\text{cm} \cdot \text{p}}{\text{mol} \cdot \text{grad} \cdot \text{K}} \right]$

T : Absolute Temperatur $[\text{grad}^{\circ}\text{K}]$, bei der die Messung durchgeführt wurde

: Kolloidosmotischer Druck $[\text{cmH}_2\text{O}]$ oder $\left[\frac{\text{p}}{\text{cm}^2} \right]$

C : Konzentration der Meßlösung $\left[\frac{\text{g}}{\text{l}} \right] \cdot 10^{-3} \left(= \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right)$

Gleichung 12 ergibt sich aus dem van't Hoffschen Gesetz (Gl. 1, s.

S. 2) durch Überführen der molaren Konzentration (c) in die Gewichtskonzentration (C) (Gl. 12)...

$$\pi = \frac{1}{MG} \cdot C \cdot R \cdot T \quad (\text{Gl. 13})$$

und Auflösung nach dem Molekulargewicht (MG) für Lösungen unendlicher Verdünnung ($(\frac{\pi}{C})_{C \rightarrow 0}$) (124).

Für monodispers gelöste Substanzen ergibt sich nach dieser Berechnung das jeweilige Molekulargewicht (MG), für polydispers gelöste Stoffe das numerisch mittlere Molekulargewicht ($\bar{M}_n$).

Die osmotrische MG-Bestimmung reiner Substanzen bekannten Molekulargewichts bietet die Möglichkeit der Prüfung der Zuverlässigkeit des modifizierten Hansen-Osmometers:

Dazu wurden verschieden konzentrierte Lösungen der selben Substanzen hergestellt, die schon bei den Selektivitätsuntersuchungen der Membranen verwendet wurden (s. S.45).

Gemessen wurde der KOD dieser Lösungen mit dem modifizierten Hansen-Osmometer unter Verwendung der Membran PM 10 bei der Temperatur von 28°C. Das Ausmaß der Streuung der Meßpunkte um die Regressionsgerade und der ermittelte Wert für das Molekulargewicht der bekannten Substanzen sind Zeichen für die Güte einer KOD-Messung (Abb. 12 und Tab. V):

Tab. V:

OSMOMETRISCH GEMESSENE MOLEKULARGEWICHTE IM VERGLEICH ZU STANDARDWERTEN DER LITERATUR

SUBSTANZ	MOLEKULARGEWICHT		Differenz
	LIT.	EXP.	
RINDER-ALBUMIN	70 000	71 200	1,7%
HÄMOGLOBIN	61 500	61 700	0,4%
OVALBUMIN	45 000	47 100	4,7%
CHYMOTRYPSINOGEN A	21 500	21 400	0,5%

Angegeben sind Literaturwerte (LIT.), eigene osmotrische Meßwerte (EXP) sowie die prozentuale Differenz.

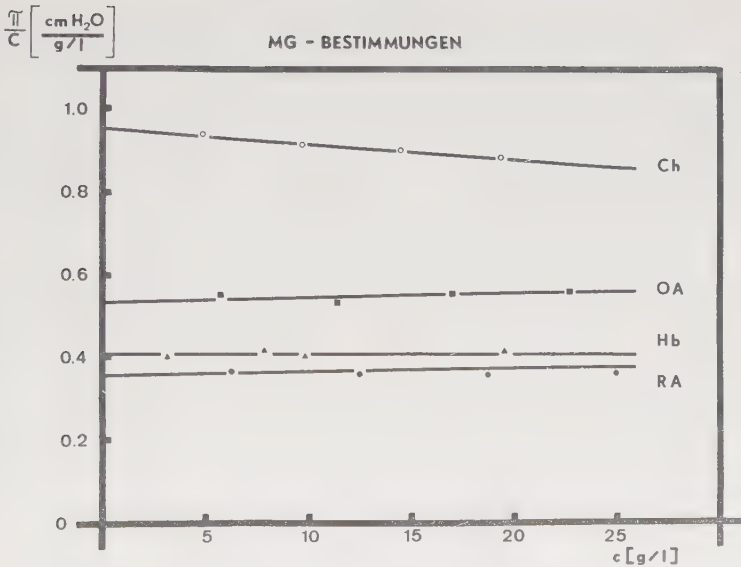


Abb. 12: Osmometrische Molekulargewichtsbestimmung:
Graphische Extrapolation des reduzierten osmotischen
Drucks auf die Konzentration Null.

Abszisse: Konzentration (C) der Meßlösungen $\left[\frac{\text{g}}{\text{l}} \right]$

Ordinate: Reduzierter osmotischer Druck $\left(\frac{\pi}{C} \right) \left[\frac{\text{cmH}_2\text{O}}{\text{g/l}} \right]$

RA: Rinder-Albumin, Regressionsgerade $\left(\frac{\pi}{C} \right) = 0,3543 + 0,008c$.

HB: Hämoglobin, Regressionsgerade $\left(\frac{\pi}{C} \right) = 0,4092 + 0,001c$.

OA: Ovalbumin, Regressionsgerade $\left(\frac{\pi}{C} \right) = 0,5361 + 0,008c$.

Ch: Chymotrypsino-
gen A Regressionsgerade $\left(\frac{\pi}{C} \right) = 0,9556 + 0,0038c$.

3. Verhalten von Gelen und Gel-Proteinlösungen

Lösungen im Gel-Zustand sind der Extremfall makromolekularer Wechselwirkung: Die äußere Beweglichkeit der einzelnen Moleküle ist nahezu aufgehoben und die gelösten Moleküle bilden durch Bindung an die Nachbarmoleküle ein räumliches Netzwerk (Matrix) (95, 123). Obwohl an der Oberfläche eines Gels zu einer umgebenden Lösung osmotische Kräfte wirksam werden, ist keine Membran zur Realisierung dieser Grenzfläche erforderlich. Ist das Gel im osmotischen Gleichgewicht von freiem Solvens umgeben, befindet es sich im vollhydrierten Zustand und es ist kein Druckgradient vom Inneren des Gels zur umgebenden Flüssigkeit vorhanden. Entfernt man jedoch die Flüssigkeit und läßt das Gel an der Luft trocknen, verdunstet Wasser von der Oberfläche und das Gel beginnt zu schrumpfen. Die elastischen Eigenschaften der Gel-Matrix wirken aber dieser Volumenverminderung entgegen und das erforderliche Kräftegleichgewicht läßt einen negativen Druck im noch im Gel verbliebenen Wasser entstehen, der entgegengesetzt und gleich groß dem Matrix-Druck ist.

Dieser Dehydrationsdruck kann durch die erwähnte "wick-technique" (123) oder noch einfacher im Hansen-Osmometer gemessen werden. Wie Abbildung 13 zeigt, entwickelt sich beim Einbringen einer erwärmten und noch nicht erstarrten Agar-Lösung¹⁾ in das Osmometer ein kolloidosmotischer Druck, der einen konstant bleibenden Wert erreicht. Die Agar-Moleküle sind durch ihre Größe nicht in der Lage, die Membran zu permeieren. Im Verlauf des Niveaus vollzieht sich die Umwandlung der Lösung in den Gel-Zustand, ohne daß eine KOD-Änderung bemerkbar wäre. Es wird also direkt der KOD des Gels gemessen. Im weiteren Verlauf kommt es zur Verdampfung des im Gel befindlichen Wassers und zur Ausbildung eines überproportional zunehmenden, negativen Dehydrations- oder Matrixausdehnungsdruckes. Nach Überschichten der Geloberfläche mit Lösungsmittel (Pfeil), erfolgt eine Dehydrierung des Gels mit Abfall des gemessenen Drucks auf den Ausgangswert des vollhydrierten Gels.

¹⁾ Rein-Agar, Behringwerke AG, Marburg-Lahn

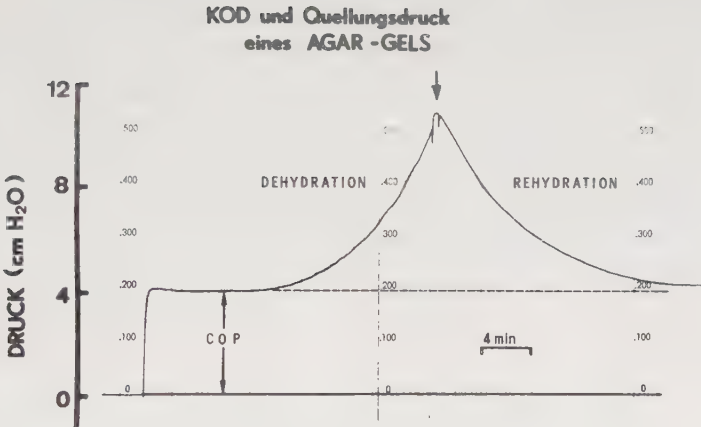


Abb. 13: Originalregistrierung des Kolloidosmotischen Druckes eines Agar- Gels (Konz. 10 g/l) bei zunehmender Dehydrierung und Rehydrierung.

Verwendete Membran PM 10,

Pfeil: Zeitpunkt der beginnenden Rehydrierung durch Auftropfens von Wasser.

Abszisse: Zeit [min].

Ordinate: KOD bzw. Dehydrationsdruck [cmH₂O]

Der Dehydrationseffekt eines Gels läßt sich im Osmometer auch ohne Membran reproduzieren, ein Beweis dafür, daß es sich bei dem beschriebenen Experiment nicht etwa um einen Druckanstieg des KOD durch Konzentrationserhöhung infolge Wasserverdampfung handelt: Dazu wurde eine Scheibe Filterpapier mit erwärmter Agar-Lösung getränkt und in der selben Weise wie eine Membran in das Hansen-Osmometer eingespannt (Abb. 14 rechts). Das Filterpapier dient der Erhöhung der mechanischen Belastbarkeit des sich bildenden Agar-Gels und besitzt keinerlei Membraneigenschaften für Makromoleküle. Der Dehydrationsdruck, den dieses Gel bei zunehmender Austrocknung an der Luft entwickelt, zeigt einen zunehmenden Anstieg mit dem Grad der Austrocknung. Dieses Verhalten spiegelt analog dem osmotischen

Verhalten einer makromolekularen Lösung die osmotischen Eigenschaften der eine Gel-Matrix bildenden Agar-Moleküle wider.

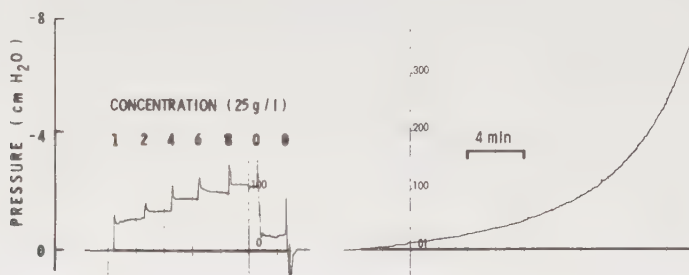


Abb. 14: Druckmessungen an einem in Filterpapier eingebetteten Agar-Gel (Konz. 0,5 g/100 ml), das im Hansen-Osmometer einer Dehydration ausgesetzt wird.

Abszisse: Zeit [min.]

Ordinate: Dehydrationsdruck der Gel-Matrix [cmH₂O]

Rechts : Dehydration durch Wasserverlust infolge Austrocknung

Links : Dehydration durch Albuminlösungen zunehmender Konzentrationsstufen von 1 bis 10.

Eine Konzentrationsstufe entspricht 25[g/l].

Die Dehydration des Gels sollte theoretisch nicht nur durch Austrocknung sondern auch durch kolloidosmotische Kräfte möglich sein. Voraussetzung dazu ist, daß das Netzwerk der Gel-Matrix dicht genug ist, der Diffusion von Makromolekülen aus der umgebenden Lösung in das Gel hinein Widerstand entgegenzusetzen, also einen hohen Reflektionskoeffizienten für das umgebende Lösungssystem besitzt. In diesem Fall entwickelt sich ein osmotischer Druckgradient zwischen dem Gel und der umgebenden Lösung, dadurch tritt Wasser vom Gel zur makromolekularen Lösung über, das Gel beginnt zu schrumpfen und es muß sich ein negativer Druck (Dehydrationsdruck) im Gel entwickeln. Dieser Effekt läßt sich durch Überschichtung eines im Osmometer befindlichen Agar-Gels mit verschiedenen konzentrier-

ten Albuminlösungen nachweisen (Abb. 14 links).

Zunächst überrascht das Ergebnis, daß die Druckerhöhungen im Gel mit zunehmender Albuminkonzentration fortschreitend geringer werden. Dieses Phänomen erklärt sich wie folgt: Der resultierende, im Osmometer gemessene Druckverlauf ist der Ausdruck der algebraischen Summe zweier entgegengesetzter Kräfte und repräsentiert das Gesamtpotential des Wassers im System Gel-Albuminlösung. Im Gel entsteht mit zunehmender Dehydration ein wachsender Matrixdruck welcher dem schrittweise erhöhten KOD der umgebenden Albuminlösung entgegenwirkt.

IV. Physiologische Untersuchungen:

KOD bei Hämodilution

Es wurden Messungen des KOD von Serum und Lymphe von Hunden bei akuter, extremer Hämodilution durch isovolämischen Blutersatz mit Lösungen von Dextran 60¹⁾ und Gelatine²⁾ durchgeführt. Die Technik der Hämodilution, Einzelheiten der rheologischen Untersuchungen und Ergebnisse finden sich bei Messmer et al. (89): Zur Hämodilution wurden arteriell 10 ml/kg Körpergewicht Blut in 60-80 Sekunden entzogen und sofort unter Druckinfusion durch gleiche Mengen normothermer kolloidaler Lösungen ersetzt. Die Hämodilutionsschritte wurden in Abständen von zehn Minuten wiederholt bis der Hämatokrit Werte von etwa 7% erreicht hatte. Nach jeder Stufe wurden Blutproben entnommen, heparinisiert und das zentrifugierte Plasma sofort im modifizierten Hansen Osmometer über die Membran PM 10 gemessen. Die Lymphproben wurden dem kanalisierten Ductus thoracicus entnommen. Die angeführten Meßergebnisse wurden bei jeweils sechs Hunden gewonnen.

1. Veränderungen im KOD des Plasmas und der Lymphe

Beide zur Hämodilution verwendeten kolloidalen Lösungen erwiesen sich in vitro bei 37°C und Verwendung der Membran PM 10 als hyperonkotisch im Vergleich zu Serum:

6 % Dextran 60-Lösung¹⁾: KOD in vitro $91,6 \pm 1,9 \text{ cmH}_2\text{O}$

3,5% Gelatine-Lösung²⁾ : KOD in vitro $39,6 \pm 4,3 \text{ cmH}_2\text{O}$ ³⁾

Die unterschiedliche onkotische Wirkung und Polydispersität der beiden Kolloidlösungen führten zu voneinander abweichenden Effekten im

1) Macrodex^R, Fa. Knoll AG, Ludwigshafen

2) Hämaccel^R, Fa. Behringwerke AG, Marburg-Lahn

3) Der KOD-Wert wurde bei der Meßzeit von 10 Minuten bei ange-näherten Kurvenniveau abgelesen. Die besondere Problematik der permeierenden Substanzen (s.S. 37) blieb unberücksichtigt.

transkapillären Flüssigkeitsaustausch (Abb. 15). Die Dextran-Lösung zeigte nicht nur die Fähigkeit, die natürliche kolloidosmotische Wirksamkeit der Plasmaproteine zu ersetzen, sondern erhöhte in signifikanter Weise ($p < 0,001$) den KOD des Plasmas auf Werte um 58 cmH_2O . Gleichzeitig kam es zu einem nahezu parallel verlaufenden Anstieg des KOD der Lymphe.

Die Hämodilution mit Gelatinelösung führte nicht zu signifikanten Veränderungen im KOD des Plasmas ($p > 0,05$). Der KOD der Lymphe nahm dagegen im Verlauf der Hämodilutionsschritte zu ($p < 0,01$).

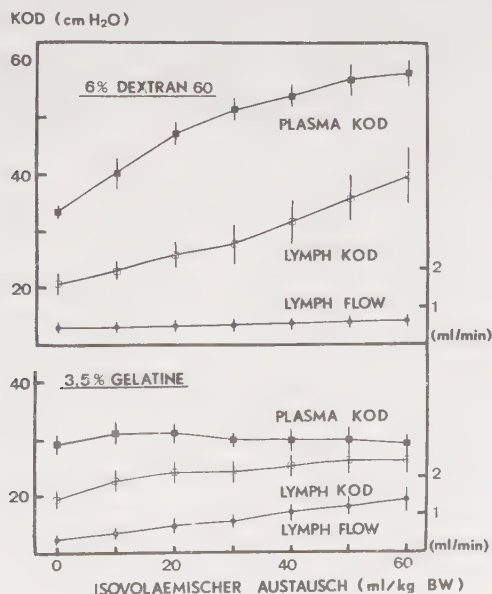


Abb. 15: Effekt von isovolämischer Hämodilution mit Dextran 60- und Gelatine-Lösungen auf den KOD von Plasma und Lymphe. Angegeben sind die Mittelwerte und der mittlere Fehler des Mittelwerts von Messungen bei jeweils 6 Hunden. Abszisse: Infundierte Menge der Kolloidlösung [ml/kg Körpergewicht]
Ordinate links: KOD in [cmH₂O]
Ordinate rechts: Lymphfluß im Ductus thoracicus [ml/min.]

2. Korrelation von KOD der Lymphe und Lymphfluß

Neben Veränderungen im KOD der Lymphe ließen sich Unterschiede im Lymphfluß feststellen: Bei Hämodilution mit Gelatine-Lösung kam es zu einer bedeutend größeren Zunahme des Lymphflusses im ductus thoracicus als bei Verwendung von Dextran-Lösung (Abb. 15).

Für den transkapillären Flüssigkeitsaustausch ist die osmotische Wirksamkeit von Makromolekülen, welche die Kapillarwand permeieren können, vom Ausmaß ihres sofortigen Abtransports über die Lymphbahnen abhängig. Die Hämodilution mit Dextran- oder Gelatine-Lösung zeigte unterschiedlichen Effekt auf die Korrelation von KOD der Lymphe und Lymphfluß (Abb. 16):

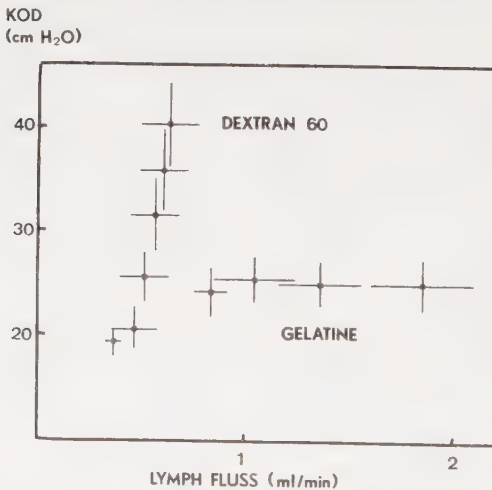


Abb. 16: Korrelation von Lymphfluß und KOD der Lymphe bei isovolämischer Hämodilution mit Dextran 60- und Gelatine-Lösungen. Angegeben sind die Mittelwerte und der mittlere Fehler des Mittelwerts von Messungen bei jeweils 6 Hunden.

Abszisse: Lymphfluß aus dem ductus thoracicus [ml/min]
 Ordinate: KOD der Lymphe cmH₂O

3. Hydrostatischer Druck in implantierten perforierten Kapseln

Bei zwei Hunden, denen drei Wochen vor Hämodilution perforierte Glaskapseln (n. Guyton (37)) unter die Bauchhaut implantiert wurden, konnten Messungen des hydrostatischen Drucks in diesen Kapseln während akuter Hämodilution vorgenommen werden (56):

Während des isovolämischen Blutaustauschs mit Dextran 60-Lösung entwickelte sich der hydrostatische Kapseldruck zunehmend zu höheren negativen Druckwerten (Abb. 17):

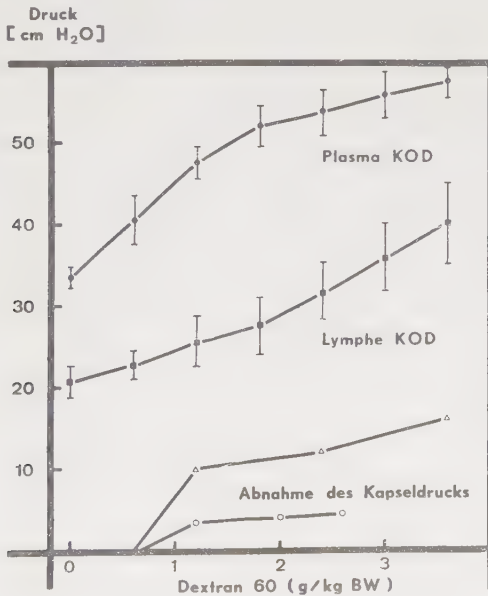


Abb. 17: Änderungen des hydrostatischen Drucks in implantierten perforierten Kapseln (2 Hunde) und des KOD von Plasma und thorakaler Lymphe (6 Hunde) während isovolämischer Hämodilution mit 6% Dextran 60-Lösung. Die Meßwerte wurden zusammen mit Messmer et al. (89) gewonnen.
 Abszisse: Infundierte Menge Dextran 60 [g/kg Körpergewicht]
 Ordinate: Druck [cmH₂O]

E. DISKUSSION

I. Meßmethoden

1. Kritischer Vergleich statischer und dynamischer Verfahren

Die Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Osmometer besitzen trotz unterschiedlicher Details der Konstruktion eine Reihe gemeinsamer Fehlermöglichkeiten:

Undichtigkeit des Meßsystems durch Ventile und Hähne, Probenverschleppung und -verdunstung während der Messung, bakterielle Kontamination der Meßprobe, Flüssigkeitsnachlauf in Kapillaren, Luftblasen im Lösungsmittel oder der Lösung, Balloneffekte der Membran und Empfindlichkeit auf Temperaturschwankungen.

Unter den Steigrohrsmometern lassen sich nach Elias, Ritscher und Patat (22) bei symmetrischen, ventillosen Zweikammerosmometern noch am leichtesten die genannten Fehlermöglichkeiten eliminieren. Die verschiedenen dynamischen Methoden zur Abkürzung der Meßzeit beinhalten Fehler durch Interpolation ohne genaue Kenntnis der Lage des Gleichgewichts. Aus vergleichenden Untersuchungen der verschiedenen Methoden durch die genannten Autoren (22) geht hervor, daß sich für genauere osmotische Messungen nur die statische Methode eignet.

Die Nachteile der statischen Methode, nämlich lange Einstellzeiten, große Meßvolumina und Verdünnung der Meßprobe durch das Lösungsmittel sind durch das elektronische Meßverfahren nach Hansen eliminiert worden. Die kurze Einstellzeit von etwa vier Minuten und der geringe Lösungsmittelfluß von $4 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3/\text{mmHg}$ erlauben schnelle und genaue Messungen. Das benötigte Probenvolumen ist einschließlich der Vorspülung nur 0,2 ml. Die Druckmeßkammer besitzt keine Ventile, die Undichtigkeiten hervorrufen könnten. Die Erhitzbarkeit der Manometerkammer und Meßkammereinheit erlaubt das Auskochen mit destilliertem Wasser, wodurch Luftblasen im System ausgetrieben werden und eine Sterilität hergestellt werden kann.

2. Die Meßmethode nach A. T. Hansen und die eigene Modifikation

KOD-Messungen an Proteinlösungen von geringerer Konzentration als Humanserum (z.B. Lymphe) oder die Molekulargewichtsbestimmung makromolekularer Lösungen verlangen eine hohe Meßgenauigkeit. Der Routine-Laborbetrieb erfordert eine Standardisierung und Vereinfachung der Bedienung des Hansen-Osmometers. Durch Modifikation des Meßgerätes, der Meßvorbereitung und des Meßvorgangs konnte die Meßgenauigkeit bis auf das fünffache der Originalmethode gesteigert werden und die Bedienung des Instrumentes dabei noch vereinfacht werden.

a. Meßanordnung

Die Verwendung einer Zusatzdichtung, die radiale Lecks sicher verhindert, ermöglichte den Einsatz einer Membran sehr hoher Wasserpermeabilität. Dadurch konnten die Meßzeit auf die Hälfte verkürzt und temperaturabhängige Druckschwankungen eliminiert werden. Eine verbesserte Thermostasierung erlaubt die für manche Lösungen notwendige Messung im physiologischen Temperaturbereich von 37°C bei kleinem Meßprobenvolumen ohne die Gefahr der Verdunstung und damit der Konzentrationserhöhung der Lösung. Die festinstallierte stufenlose Saugung und Spülung der Membran erleichtert und beschleunigt den Routinemeßbetrieb und ermöglicht die Zwischenschaltung eines Sammelgefäßes zur Rückgewinnung wertvoller Meßproben.

b. Das Problem der Eichung

Die Eichung von Osmometern ist mit zwei verschiedenen Verfahren möglich:

Eichung mit hydrostatischem Druck und

Eichung über eine bekannte Standardproteinlösung.

Die Eichung mit hydrostatischem Druck sollte, um linearitätsbedingte Fehler des Meßsystems zu reduzieren, am besten im Meßbereich erfolgen. Die im methodischen Teil beschriebene eigene Eichanordnung erlaubt eine Eichung des Meßsystems im negativen hydrostati-

schen Druckbereich, im selben Bereich also, in dem die Messungen erfolgen. Diese Eichung kann und soll ohne und mit Membran durchgeführt werden. Nur wenn beide Messungen identische Werte ergeben, können Fehler durch Undichtigkeit des Meßsystems oder durch Balloneffekte der Membran sicher ausgeschlossen werden.

Die Eichung über eine bekannte hochmolekulare Standardlösung ist eine vielfach in der Osmometrie verwandte Methode. Sie ist jedoch keine absolute Messung physikalischer Größen sondern eine relative Messung, die auf einem Vergleich von verschiedenen Lösungs-Membransystemen beruht, die als gleich angenommen werden. Es überlagern sich Fehlermöglichkeiten des Osmometersystems und der Membran. Eine Eichung durch verschieden starkes Spannen der Membran und dadurch das Einstellen eines als richtig angenommenen KODs einer Standardlösung, wie es von Intaglietta und Zweifach (55) mit einer Meßanordnung nach Hargens und Scholander (44) vorgeschlagen wird, läßt keine Beurteilung der Dichtigkeit des Meßsystems oder von Membranfehlern zu. Fehler durch Undichtigkeiten können sich gegenseitig kompensieren und so eine Fehlerfreiheit des Meßsystems und der Membran vortäuschen. Die KOD-Messung einer Standardlösung kann nur in Verbindung mit einer Eichung durch hydrostatischen Druck ohne und mit Membran reproduzierbare Werte liefern. Nur dann ist eine Beurteilung der Brauchbarkeit der Membran möglich und das Membran-Lösungsmittel-System definiert. Ein festgestellter unterschiedlicher KOD der Standardlösung gegenüber früheren Messungen mit anderen Membranen weist auf die unterschiedlichen Membraneigenschaften hin. Eichet man nur mit Hilfe der Standardlösung wird dieser Unterschied durch Änderung der Meßverstärkung verschleiert und Messungen verschiedener makromolekularer Lösungen sind nicht mehr vergleichbar.

Die modifizierte Eichanordnung am Hansen-Osmometer hat gegenüber anderen Osmometern also den Vorteil, daß jederzeit eine Überprüfung der Eichung im Meßbereich möglich ist und Fehlerquellen erkannt werden.

c. Meßgenauigkeit

Eine reproduzierbare Messung ist nur zu erreichen, wenn ein Meßfehler durch Probenverschleppung im Rezeptakulum der Meßkammer vermieden werden kann und die Nulllinienkonstanz gewährleistet ist. Die beschriebene Vorspülung der Membran mit der Meßprobe und die Anordnung des Saugsystems vermeidet eine artifizielle Verdünnung der Meßprobe. Entgegen der Empfehlung Hansens (43), daß nach einer Messung ein Abwarten auf die Rückkehr zur Nulllinie unnötig ist, scheint dies doch sehr notwendig. Insbesondere bei pathologischen Humanseren, bei Seren von mit künstlichen Kolloiden behandelten oder mit Hilfe eines extrakorporalen Kreislaufs operierten Patienten permeieren während der Messung Anteile der Probe durch die Membran. Beim Spülen mit Kochsalzlösung kommt es dann unter der Membran zu einem länger dauernden osmotischen Effekt und dadurch zu einer Verminderung des KOD-Meßwertes der nächsten Probe, die beim Vorgehen nach Hansen (43) unentdeckt bleibt. Wartet man die Nulleinstellung des Meßgerätes nicht ab, kommt es dennoch nicht zu einer Verkürzung der Meßzeit, da sich das Meßwertniveau nur im Zustand des osmotischen Gleichgewichts einstellen kann und damit das Gleichgewicht der permeierten Anteile ebenfalls abgewartet werden muß.

Bei zehn hintereinander erfolgenden Messungen desselben Humanserums ergab sich nach Hansen (43) eine Meßgenauigkeit von $\pm 6,8$ mmH₂O. Nach Ladegaard-Pedersen (65) ergaben 113 Einzelmessungen an acht verschiedenen Albuminlösungen eine Standardabweichung von $\pm 4,3$ mmH₂O. Ingerslev et al. (54) fand eine Meßgenauigkeit des Hansen-Osmometers mit einer Standardabweichung von $\pm 5,5$ mmH₂O. English et al. (23) eine Standardabweichung von $\pm 12,2$ mmH₂O. Mit dem Hansen-Osmometer in der beschriebenen modifizierten Form beträgt die Abweichung des Endwertes der Messung von Humanseren oder Albuminlösungen maximal ± 1 mmH₂O und liegt damit schon nahe an der Ablesegenauigkeit der Meßkurve des Kompensationsschreibers. Erst diese hohe Meßgenauigkeit ermöglicht es, Messungen auch an niedriger konzentrierten makromolekularen Lösungen durchzuführen und erweitert die Anwendungsmöglichkeit des Hansen-Osmometers für Untersuchungen der Physiologie des interkapillären Flüssigkeitstausches.

II. Membranmaterial

1. Auswahl der Membranen

Ziel der Membranuntersuchungen war, unter dem großen Angebot des kommerziell zur Verfügung stehenden Membranmaterials eine Membransorte zu finden, die für den Routinebetrieb des modifizierten Hansen-Osmometers im klinischen Labor zuverlässig und möglichst problemlos geeignet ist. Als die wichtigsten Kriterien zur Membran-Auswahl erwiesen sich die mechanischen Eigenschaften, die hydraulische Leitfähigkeit und die Selektivität einer Membran.

Die von verschiedenen Autoren zur Charakterisierung einer Membran zusätzlich vorgeschlagenen Membraneigenschaften wie Permeabilitätskoeffizient, Durchlässigkeit oder Darcy-Koeffizient bringen als Auswahlkriterien keine weiteren Vorteile:

Für die Verwendung einer Membran im Osmometer stellt die hydraulische Leitfähigkeit die direkt die Meßzeit bestimmende Größe dar und eine Berechnung weiterer Koeffizienten unter Berücksichtigung von Dichte oder Viskosität des Lösungsmittels und Membrandicke liefern keine entscheidenden Kriterien zur Membranauswahl. Das einfache Verfahren, durch Anlegen eines rechteckförmigen Durchsprungs auf das Osmometer-System die hydraulische Leitfähigkeit zu prüfen, ließ die Uneinheitlichkeit und Fehlerhaftigkeit der Zellulose-Membranen (SM-Reihe) innerhalb einer Sorte offenkundig werden. Die Abweichungen waren dabei umso größer, je "dichter" die Membran und je geringer die hydraulische Leitfähigkeit war (Tab. I).

Durch Voruntersuchungen auf Fehlerhaftigkeit konnten Membranen jeder Type ausgewählt werden, deren hydraulische Leitfähigkeit annähernd den Herstellerangaben entsprach (Tab. II). Überraschend war, daß die anisotropen Membranen der Type PM 10 selbst nach zweiwöchigem Meßbetrieb (ca. 150 Messungen) zuverlässigere und schnellere Messungen möglich machten als Zellulose-Membranen. Die vielfach in der Literatur beschriebene "Ermüdung" der Membranen durch Absorptionsphänomene machte sich naturgemäß erst dann deutlich bemerkbar, wenn Messungen von Lösungen stark polydisper-

sen Charakters mit Anteil an permeationsfähigen Molekülen durchgeführt wurden.

2. Das Problem der Selektivitätsgrenze

Wie die Ergebnisse unserer Membranuntersuchungen zeigen, läßt sich aus der hydraulischen Leitfähigkeit oder der Berechnung der angegebenen Koeffizienten kein Rückschluß auf die Selektivität einer Membran ziehen. Eine Membran besitzt hydraulischer Leitfähigkeit dann, wenn sie sowohl wegen einiger Makroporen (Mehrfachheit) als auch wegen ihres besonderen Membranenaufbaus besitzen. Deshalb können theoretische Berechnungen eines fiktiven Porenradius aus dem Verhalten einer Membran gegenüber dem Lösungsmittel, wie es Renkin et al. (110, 111) vorschlägt, keine Aussage über die Selektivität einer Membran liefern. Unsere Beobachtungen be- weisen also die Anschauung von Schulz und Kühn (125), daß zur Beurteilung der Selektivität zusätzliche Verfahren nötig sind. Dabei sind Ultrafiltrationsmembranen (22) durch die Molekulargewichte des Nachweises bestimmt, Selektivitätsmembranen durch die geringe Zahl von geeigneten Substanzen begrenzt. Methoden der chemischen Molekulargewichtsbestimmungen oder KOD-Messungen an verdünnten Lösungen (47) erfordern zur Bestimmung der Selektivität einer Membran ebenfalls den chemisch-physikalischen Nachweis geringster Konzentrationsänderungen. Diese Meßprobleme konnten mit dem Hansen-Osmometer dadurch umgangen werden, daß Heuristicskriterien aus der Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der osmotischen Messung entwickelt wurden.

Die Bestimmung der Selektivität einer Membran ist darüber hinaus aus folgenden Grunde problematisch: Die Herstellung einer idealen, genau definierten selektiven Membran ist bisher nicht möglich. Der gebräuchliche Ausdruck einer "Selektivitätsgrenze" entspricht der Idealvorstellung eines exakten "molecular cut off", entsprechend einer sprunghaften Änderung des Reflektionskoeffizienten von 0 auf 1. Tatsächlich liegt aber ein Molekülgrößenbereich vor, in dem der Diffusionswiderstand der Moleküle (Reflektionskoeffizient) stetig ansteigt. Die experimentelle Bestimmung einer "Selektivitätsgrenze" sollte

demnach immer einen Molekulargewichtsbereich ergeben, dessen Größe von der Qualität der verwendeten Membran (Membranporenverteilung), der Anzahl der zur Verfügung stehenden Substanzen und der Genauigkeit der Nachweismethode einer Permeation abhängt. Ein Versuch unter Verwendung einer großen Anzahl monodispers gelöster Substanzen, die sich im Molekulargewicht nur gering unterscheiden, den Molekulargewichtsbereich solange einzuengen, bis die fiktive Selektivitätsgrenze erreicht scheint, ist wegen des Problems des Permeationsnachweises nicht sinnvoll. Zwar erlaubt die Empfindlichkeit des modifizierten Hansen-Osmometers bei der Membrantype PM 10 mit einer nominalen "Selektivitätsgrenze" von MG 10 000 noch den Nachweis einer Permeation globulärer Makromoleküle des MG 24 000, die Diffusion einzelner noch kleinerer Moleküle läßt sich jedoch mit noch keiner Methode erfassen. Eine Definition der "Selektivitätsgrenze" als Funktion des Molekulargewichts vernachlässigt außerdem die molekulare Konfiguration des Soluts (Kugelform, Fadenform), die für die Permeation von wesentlicher Bedeutung ist.

Die Ergebnisse der KOD-Messung verschiedener polydisperser Systeme ergaben zudem Übereinstimmung mit der Theorie Stavermanns (132, 133) vom Vorliegen eines thermodynamisch irreversiblen Vorgangs bei Permeation und bewiesen: Reproduzierbare Messungen können nur dann erzielt werden, wenn eine Permeation von Makromolekülen ausgeschlossen werden kann, die in ihrer Größenordnung im Bereich der "Selektivitätsgrenze" liegen.

III. Ergebnisse physikalisch-chemischer Untersuchungen

1. Der KOD makromolekularer monodisperser Lösungen

Für den osmotischen Druck einer idealen Lösung gilt die Gleichung von van't Hoff (Gleichung 1). Bei makromolekularen Lösungen wird allgemein üblich diese Beziehung durch eine Potenzreihe der Konzentration ersetzt (Gleichung 2). Wie Abbildung 10 zeigt, ließ sich für unsere Human-Albumin-Standardlösung ein Polynom finden, das die gemessene Korrelation von KOD und Konzentration in hohem Maße annähert. Dabei erwiesen sich der dritte und die höheren Virialkoeffizienten bei physiologischen Konzentrationen als vernachlässigenswert klein. Dies berechtigte, im Größenordnungsbereich des Molekulargewichtes von Albumin osmotische Molekulargewichtsbestimmungen durch einfache graphische Extrapolation durchzuführen: Wandelt man Gleichung 2 folgendermaßen um (Gl. 14):

$$\frac{\pi}{c} = \frac{R \cdot T}{M} + A_1 \cdot c + A_2 \cdot c^2 + \dots \quad (\text{Gl. 14}).$$

und erweist sich der dritte Virialkoeffizient (A_2) als vernachlässigenswert klein, erhält man Gleichung 15:

$$\frac{\pi}{c} = \frac{R \cdot T}{M} + A_1 \cdot c \quad (\text{Gl. 15}).$$

Diese Gleichung beschreibt eine Gerade mit ($\frac{R \cdot T}{M}$) als Ordinatenabschnitt und (A_1) als Neigung. Wie Abb. 12 zeigt, ergaben sich für vier verschiedene makromolekulare Substanzen solche Geraden. Wäre eine Abweichung von der Linearität festzustellen, würde dies auf einen nicht zu vernachlässigenden Wert des dritten Virialkoeffizienten hinweisen. Der erste Virialkoeffizient ist Ausdruck einer Stoffkonstanten, nämlich des Molekulargewichts. Der gering unterschiedliche Wert dieses Koeffizienten bei den Ergebnissen der Messungen an Human-Albumin und Rinder-Albumin wird durch unterschiedliche Reinheit der beiden Substanzen hervorgerufen.

Bei Verwendung einer geeigneten Membran und reiner, nicht permeabler Substanzen gelangen osmotische Molekulargewichtsbestimmungen großer Genauigkeit (Tab. V). Wie nach den Ergebnissen der Mem-

branuntersuchungen zu erwarten ist, zeigte sich mit abnehmendem Molekulargewicht der untersuchten Substanzen eine Zunahme des prozentualen Fehlers der Molekulargewichtsbestimmung: Bei Annäherung der Molekülgröße des Soluts an die "Porengröße" (Selektivitätsbereich) der Membran werden nicht mehr alle Moleküle reflektiert und die Problematik von Permeationsvorgängen muß in Betracht gezogen werden. Hier ergibt sich die membranspezifische Begrenzung der Anwendung des osmotischen Verfahrens zur Molekulargewichtsbestimmung.

2. Der KOD makromolekularer polydispenser Lösungen

Die bis heute problematische Messung des KOD von polydispersen Proteinlösungen hat in der Vergangenheit zur Aufstellung empirischer Formeln geführt, mit deren Hilfe aus der Bestimmung der Eiweißkonzentration und Zusammensetzung von Lösungen der kolloidosmotische Druck zu errechnen sein soll: Für das menschliche Serum geben Autio et al. (7), Armstrong et al. (4), Bjørneboe und Birger-Jensen (9), Ingerslev et al. (54), Landis und Pappenheimer (71), Losowski (81), Ott (99), Scatchard (118) und Wells (142) Formeln und Nomogramme an, aus der Albumin- und Totalprotein-konzentration den KOD des Serums zu errechnen. Nach Autio et al. (7) und eigenen Überprüfungen ergibt jedoch die Anwendung der verschiedenen Formeln auf ein normales Humanserum Abweichungen der berechneten KOD-Werte von 30 bis 100 % vom gemessenen Wert:

Der Grund für diese Kalkulationsfehler mag zum einen Teil in unterschiedlichen Proteinbestimmungsmethoden und Elektrophoreseverfahren und deren Fehlermöglichkeiten liegen, zum schwerwiegenderen Teil jedoch in der Tatsache, daß die intermolekulare Wechselwirkung und der sterische Exklusionseffekt der Proteinmoleküle nicht berücksichtigt wurde.¹⁾ Vielfach wird wie bei Ott (99) aus gemes-

1) Zu einer Berechnung des KOD einer polydispersen Lösung bedürfte es der Kenntnis der Summe der Aktivitätsänderungen, die jede Molekülspezies durch die Anwesenheit aller anderen vorhandenen Solute erfährt. Diese ist nie bekannt.

senen Partialdrucken der Serumkomponenten eine Formel aufgestellt, mit deren Hilfe additiv der Gesamt-KOD eines Serums berechnet werden soll. Die schon theoretisch ersichtliche Unzulässigkeit eines derartigen Verfahrens konnte experimentell durch KOD-Messungen an einem einfachen Bikomponentensystem (Albumin-Agar) dargestellt werden (Abb. 11, S. 56).

Es läßt sich also feststellen:

- a. Schon 1937 betrachteten Wies und Peters (148) Formeln zur Berechnung des KOD nur solange als nützlich, als keine brauchbare Meßmethode zur Verfügung steht.
- b. Mit dem modifizierten Hansen-Osmometer liegt eine gute Meßmethode vor, die die Fehlerhaftigkeit von KOD-Berechnungen beweisen läßt.
- c. Reproduzierbare Messungen des KOD von makromolekularen Lösungen sind jeder Berechnungsformel überlegen.

3. Der Quellungsdruck von Agar-Gel:

Ein Modell und seine physiologische Relevanz

Die Bestimmung der Parameter des interstitiellen Raumes ist ein noch nicht gelöstes Problem beim Studium der Austauschvorgänge in der Endstrombahn (s.S.10). Der interstitielle hydrostatische und kolloidosmotische Druck stellt das Resultat der Organisation der interstitiellen Matrix dar. Untersuchungen am intakten, lebenden Gewebe (31, 37, 38, 39, 66, 71, 122, 136, 141, 145) erlauben zwar Aussagen über die physiologische Funktion des Interstitiums, nicht aber eine Interpretation der molekularen Vorgänge. Untersuchungen auf der molekularen Ebene müssen sich deshalb mit den physikalisch-chemischen Eigenschaften der retikulären und kollagenen Fasern, der zur Gelbildung fähigen Mucopolysaccharide und hochmolekularen Proteine befassen. Übereinstimmung herrscht bei vielen Autoren über die Vorstellung, daß sich zwischen den kollagenen Fasern des Interstitiums hochmolekulare Lösungen (z.B. Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat) im Gelzustand befinden und mit den transkapillär filtrierte Molekülen (Wasser, Elektrolyte, Proteine) in Wechselwirkung treten (71, 72, 73, 74, 75, 76, 85, 90).

Die eigenen Untersuchungen des Verhaltens eines Systems Agargel-Albuminlösung stellen den Versuch dar, an einem einfachen in-vitro Modell mögliche Mechanismen des interstitiellen Flüssigkeitstransports sichtbar zu machen:

a. Der KOD eines Gels

Der Übergang einer hochmolekularen Lösung in den Gelzustand ist mit keiner Veränderung des KOD verbunden (Abb. 13). Diese experimentelle Beobachtung stimmt mit der thermodynamischen Betrachtungsweise überein (95, 123): Die äußere Beweglichkeit der Makromoleküle wird im Grenzfall der Lösung zum Gelzustand nahezu aufgehoben, die innere Flexibilität wird kaum betroffen und es kommt zu keiner wesentlichen Entropieerhöhung. Das chemische Potential der Lösung (KOD) bleibt deshalb unverändert.

b. Der Quellungsdruck eines Gels

Nach Stauff (131) quillt jedes nicht maximal hydrierte Gel bei Berührung mit Wasser durch Volumenzunahme auf. Um diese Quellung zu verhindern, muß ein bestimmter Druck (Quellungsdruck) von außen auf das Gel angewendet werden. Nach Meyer et al. (90) besteht der Quellungsdruck aus einem inneren osmotischen Anteil der Makromoleküle des Gels und einem elastischen Anteil der durch makromolekulare Vernetzung entstandenen Gelmatrix. Im Gleichgewichtszustand des Gels mit freiem Solvens beträgt der Quellungsdruck Null und der innere osmotische Druck des Gels ist gleich dem Matrixausdehnungsdruck.

Experimentell konnte der KOD eines Agargels und der Quellungsdruck bei Dehydration direkt im modifizierten Hansen-Osmometer gemessen werden. Die Größe dieses Quellungsdruckes zeigte sich vom Ausmaß der Dehydration, der Konzentration des Agargels und der Konzentration einer umgebenden Albuminlösung abhängig (Abb. 13, Abb. 14), (S. 61 u. 62). Nach Meyer et al. (90) kommt zudem dem chemischen Aufbau und dem Molekulargewicht von im Gel eingeschlossenen Substanzen noch eine wesentliche Bedeutung zu, nach Stauff (131) beeinflusst die Elektrolytzusammensetzung des umgebenden Mediums (ph, Donnan-Gleichgewicht, Hoffmeistersche Reihe) den Vorgang der Quel-

lung zusätzlich. Die Gel-Quellung stellt also einen Mechanismus dar, der direkt chemische Energie in mechanische Energie (Volumenänderung, Druckänderung) umwandeln kann. Eine thermodynamische Analyse der hierbei auftretenden Kräfte findet sich bei Katchalsky (60 b).

In Analogie zu diesem einfachen Modell sind im interstitiellen Raum des Organismus Vorgänge zu erwarten, die unter dem Einfluß der molekularen Wechselwirkung von transkapillärem Filtrat und interstitieller Grundsubstanz über Druck- und Volumenänderungen Flüssigkeitsbewegungen bewerkstelligen könnten.

IV. Kompensationsmechanismen gegenüber intravaskulären kolloidosmotischen Druckänderungen

1. Das Konzept von Starling, Landis und Pappenheimer

Diese traditionelle Betrachtungsweise (71) ist auch heute noch anerkannte Basis zur Beurteilung weiterentwickelter Modellvorstellungen (s.S.9). Danach herrscht ein präzises Gleichgewicht von hydrostatischen und kolloidosmotischen Kräften, die über die Kapillarwand wirksam werden (Gleichung 16):

$$P_c + \pi_t = \pi_p + P_t \quad (\text{Gl. 16})$$

Im Normalfall liegen diese Drucke in der Größenordnung von

$$20 + 5 = 25 + 0 \text{ mmHg.}$$

Die Kompensation einer Veränderung im KOD des Blutplasmas durch Hämodilution mit kristalloiden oder kolloidalen Lösungen erfordert zur Wiederherstellung der Ausgangslage eine Filtration von Wasser in das Interstitium oder eine Reabsorption von dort. Zwei Beispiele sollen zeigen, daß eine Kompensation allein nach diesem Konzept als nicht ausreichend wirksam erscheint: Die Hämodilution mit Kristalloiden während extrakorporaler Zirkulation bei Herzoperationen führt oft zu einem Abfall des Plasma-KOD unter 10 mmHg, während bei isovolämischem Blutaustausch mit Dextran-60-Lösungen an Hunden KOD-Werte des Blutplasmas von 45 mmHg und darüber zu beobachten sind. Variationen dieser Größe werden ohne Schwierigkeiten toleriert, was bei den theoretisch geforderten exzessiven Filtrations- oder Absorptionsvorgängen unmöglich wäre. Es müssen also zusätzliche Kompensationsmechanismen vorliegen, die für die Homöostase verantwortlich sind. Da unter den erwähnten Bedingungen die Kapillarwandpermeabilität und der kapilläre hydrostatische Druck nur kleinen Veränderungen unterworfen sind, richtet sich das Hauptinteresse auf Veränderungen des hydrostatischen und onkotischen Druckes im Interstitium.

2. Negativer interstitieller hydrostatischer Druck

Das von Guyton (37, 38, 39) entwickelte Konzept beruht auf der Beobachtung, daß mit bestimmten Methoden im interstitiellen Gewebe negative hydrostatische Drucke gemessen werden (s.S. 14). Dieser subatmosphärische Druck, der nach Guyton durch onkotische Kräfte des Blutplasmas und aktive lymphatische Pumpwirkungen aufrechterhalten wird, stellt den Sicherheitsfaktor gegen Ödementstehung dar und soll das Interstitium von ungebundenem Wasser freihalten. Zur Diskussion sei dieses Konzept des Gleichgewichtszustandes in analoger Weise formuliert:

$$\begin{array}{ccccccc} P_c & + & \pi_t & = & \pi_p & + & P_t & \text{(Gl. 16)} \\ 15 & + & 5 & = & 25 & - & 5 & \text{mmHg.} \end{array}$$

Bei Verringerung des Plasma-KOD und dadurch verringerter Reabsorption wird nach dieser Modellvorstellung die Homöostase durch vermehrten Abtransport über die lymphatischen Wege aufrechterhalten. Übersteigt die Menge des nicht reabsorbierten Wassers die Leistung der "lymphatischen Pumpe", nähert sich der negative interstitielle Flüssigkeitsdruck dem atmosphärischen Druckwert und freies Wasser (Ödem) tritt auf:

$$15 + 5 = 20 + 0 \text{ mmHg.}$$

Eine Erhöhung des Plasma-KOD bewirkt dagegen in umgekehrter Weise eine Verschiebung des interstitiellen Flüssigkeitsdruckes zu stärker negativen Druckwerten:

$$15 + 5 = 30 - 10 \text{ mmHg.}$$

Zwei Voraussetzungen dieses Konzepts geben jedoch Grund zu kritischen Gegenargumenten:

- a. Die Kapillarwand wird als nahezu ideale semipermeable Membran angenommen, eine grobe Vereinfachung der tatsächlichen Struktur (s.S. 10).
- b. Die interstitielle Proteinkonzentration wird als sehr niedrig und fast konstant vorausgesetzt, eine Hypothese, die nach Messungen von Lymphfluß und Lymphkonzentration bei Hämodilutionsversuchen (39) zweifelhaft erscheint. Dabei kann die onkotische

Wirksamkeit filtrierter Makromoleküle durch Effekte der sterischen Exklusion mit der hochmolekularen interstitiellen Grundsubstanz bei schon geringen Konzentrationsschwankungen wesentliche Veränderung erfahren (Abb. 11, S. 56).

3. Variabler interstitieller onkotischer Druck

Messungen mit Mikropunktionsmethoden ergeben im Interstitium nicht negative sondern gering positive oder atmosphärische Druckwerte (71, 135, 145). Die Kompensation veränderter onkotischer Drucke im Plasma kann nach Wiederhielm (145, 147) durch Veränderung der osmotischen Kräfte im Interstitium erfolgen. Der gesenkte interstitielle onkotische Druck wird dabei durch den Effekt hochmolekularer, bindegewebiger Substanzen als höher angenommen als der KOD der freien interstitiellen Flüssigkeit allein. Bei physiologischen Verhältnissen könnte dieses Kräftegleichgewicht folgendermaßen formuliert werden:

$$\begin{array}{ccccccc} P_c & + & \pi_t & = & \pi_p & + & P_t & \text{(Gl. 16)} \\ 15 & + & 10 & = & 25 & + & 0 & \text{mmHg.} \end{array}$$

Eine Reduktion des Plasma-KOD könnte durch eine Abnahme des interstitiellen KOD infolge Verdünnung kompensiert werden:

$$15 \quad + \quad 5 \quad = \quad 20 \quad + \quad 0 \quad \text{mmHg.}$$

Eine Erhöhung des Plasma-KOD würde durch einen Anstieg des onkotischen Drucks im Gewebe ausgeglichen werden.

Es erscheint offensichtlich, daß die beiden Konzepte experimentell und theoretisch einander widersprechen und daß die entwickelten Kompensationsmechanismen nicht gleichzeitig wirksam sein können.

4. Hypothese eines variabel dehydrierten interstitiellen Gels

Die Meßergebnisse aus den geschilderten Hämodilutionsversuchen lassen eine gleichzeitige, paradox anmutende Existenz der beiden zuletzt diskutierten Kompensationsmodelle vermuten:

Wie die Abbildung 15 (S.65) zeigt, wurde durch Infusion von Dextranlösung der Plasma-KOD von 33 cmH₂O auf 56 cmH₂O angehoben. Dabei stieg der Lymph-KOD - dessen Veränderungen mit den besprochenen Einschränkungen als repräsentativ für Änderungen im interstitiellen KOD betrachtet werden soll - etwas verzögert, aber nahezu parallel an. Zugleichzeitig entwickelte der hydrostatische Druck in implantierten Kapseln zunehmend höhere negative Werte.

Es stellt sich aber im Versuch kein Gleichgewichtszustand im Sinne eines der beschriebenen Konzepte ein; sondern es führt vielmehr eine simultane Änderung sowohl von Π_t als auch von P_t zum Ausgleich:

$$\begin{array}{ccccccc} P_c & + & \Pi_t & = & \Pi_t & + & P_t & \quad (Gl. 16) \\ 15 & + & 25 & = & 42 & - & 12 & \text{ mmHg.} \end{array}$$

Die Untersuchungen zeigen eine überraschende Ähnlichkeit des Kurvenverlaufs im Gel-Modell und Tierexperiment (Vgl. Abb. 14 und Abb. 17 auf S.62 und S. 67): Betrachtet man das interstitielle Gewebe als Gel, das mit der Kapselflüssigkeit im osmotischen Gleichgewicht steht, läßt sich in Analogie zum Modellversuch die Zunahme des negativen Kapseldrucks als Dehydratationseffekt durch zunehmende onkotische Kräfte der das Gel umgebenden Flüssigkeit (Lymphe) deuten. Abhängig vom Plasma-KOD, der Kapillarwandpermeabilität für Makromoleküle und dem kapillaren hydrostatischen Druck ist demzufolge ein variabel dehydriertes interstitielles Gel denkbar. Physikochemisch ausgedrückt bedeutet dies, daß mit der Kapselmethode der Messung des sogenannten interstitiellen hydrostatischen Druckes das chemische Potential des augenblicklich im interstitiellen Gel befindlichen Wassers gemessen wird.

Abgesehen von der Einfachheit dieser Erklärung bringt die hier entwickelte Hypothese den Vorteil, einige der widersprüchlichen Aspekte der verschiedenen Konzepte von Kompensationsmechanismen zu klären:

- a. Die Flüssigkeitsbewegung zwischen Kapillare, Interstitium und lymphatischen Gefäßen kann als rein passiver Vorgang betrachtet werden, der ohne aktive Pumpwirkung oder Konzentrierungsmechanismen stattfinden kann.

- b. Die Kapillarwand muß nicht als ideale semipermeable Membran vorausgesetzt werden, sondern kann übereinstimmend mit allen morphologischen Untersuchungen begrenzte Permeabilität für Makromoleküle aufweisen. Eine Permeation von Makromolekülen behindert nicht sondern verstärkt sogar die Kräfte für die Homöostasis.
- c. Zur Erklärung der Meßergebnisse an implantierten perforierten Kapseln ist nicht die Bildung einer semipermeablen Membran um die Kapsel erforderlich, da Gele ihre osmotische Aktivität an der Grenzfläche zum Lösungsmittel auch ohne Membran ausüben.
- d. Meßmethoden, die geringe freie Flüssigkeitsmengen im Interstitium voraussetzen und deshalb künstlich herstellen (Mikropunktion), beseitigen dadurch lokal den Dehydrationszustand des interstitiellen Gels und ergeben daher atmosphärische oder positive hydrostatische Druckwerte.
- e. Die Hypothese eines negativen hydrostatischen Flüssigkeitsdruckes im interstitiellen Gewebe ist unnötig um die Meßergebnisse zu erklären.

Die hier vorgestellte Hypothese eines variabel dehydrierten interstitiellen Gels erfordert ihre Bestätigung durch weitere experimentelle und theoretische Arbeit. Sie scheint jedoch als nützliches Denkmodell zu einem besseren Verständnis des komplexen physiologischen und pathologischen transkapillären Flüssigkeitsaustausches wertvoll. Eine schnelle und sichere Routinemessung des kolloidosmotischen Druckes biologischer Flüssigkeiten ist ein Baustein dazu.

F. ZUSAMMENFASSUNG

I. Das elektronische Meßverfahren nach A. T. Hansen (43) wurde auf seine Eignung zur Messung des kolloidosmotischen Druckes (KOD) biologischer Flüssigkeiten untersucht. Für eine zuverlässige, einfache und standardisierte Bedienung dieses Osmometers im Routinebetrieb des klinischen Labors erwiesen sich folgende Modifikationen als notwendig:

1. Die Verwendung einer Zusatzdichtung ermöglicht den Einsatz einer Membran hoher hydraulischer Leitfähigkeit.
2. Eine verbesserte Thermostasierung erlaubt Messungen im physiologischen Temperaturbereich.
3. Eine festinstallierte stufenlose Saugung und Spülung erleichtert und beschleunigt den Routinemeßbetrieb.
4. Eine modifizierte Eichanordnung erlaubt eine Eichung des Meßsystems mit und ohne Membran im Meßbereich.

Das so modifizierte Osmometer läßt KOD-Messungen von Proteinelösungen mit einer Meßgenauigkeit von $\pm 1 \text{ mmH}_2\text{O}$ bei einem Endwert von $40 \text{ cmH}_2\text{O}$ zu. Es erscheint daher anderen in der Literatur beschriebenen statischen und dynamischen Verfahren zur Messung des KOD makromolekularer Lösungen überlegen.

II. Als wichtigste Kriterien der Membranauswahl erwiesen sich die mechanischen Eigenschaften, die hydraulische Leitfähigkeit und die Selektivität einer Membran. Untersuchungen dieser Eigenschaften zeigten bei Membranen aus regenerierter Zellulose eine wesentlich größere Uneinheitlichkeit und Fehlerhaftigkeit als bei anisotropen, aus synthetischen Hochpolymeren hergestellten Membranen. Die hydraulische Leitfähigkeit oder andere membranspezifische Koeffizienten lassen keinen Rückschluß auf die Selektivität einer Membran ziehen. Die sogenannte Selektivitätsgrenze entspricht einer Idealvorstellung, beschreibt aber tatsächlich nur den Molekülgrößenbereich, in dem der Diffusionswiderstand der Solutmoleküle im Meßsystem bemerkbar wird.

- III. Aus der Beobachtung des Einstellvorganges im Osmometer ergeben sich Kriterien der Beurteilung des Meßsystems und des Systems Membran-makromolekulare Lösung:
1. Nachweis von Undichtigkeiten des Meßsystems
 2. Nachweis der Permeation von Solut durch die Membran
 3. Verhältnis der Molekülgrößen eines polydispersen Solut zum Selektivitätsbereich einer Membran
- IV. Experimentelle Beobachtungen des Permeationsvorganges von Makromolekülen durch eine Membran stimmen mit der Stavermann'schen Theorie vom Vorliegen eines thermodynamisch irreversiblen Vorgangs überein.
- V. Der KOD nichtpermeabler, makromolekularer monodisperser Lösungen läßt sich in Abweichung von der idealen, linearen van't Hoff'schen Beziehung als Potenzreihe (Polynom) der Konzentration ausdrücken (Gleichung 2). Erweisen sich die höheren Virialkoeffizienten eines solchen Polynoms als vernachlässigenswert klein, können osmotrische Molekulargewichtsbestimmungen mit hoher Genauigkeit durchgeführt werden (Fehler: 1, 7 bis 7, 8%). Bei Annäherung der Molekülgröße des Solut an den Selektivitätsbereich der Membran wird dieser Fehler größer.
- VI. Mit zunehmendem Molekulargewicht des Solut wird die Abweichung des KOD von der idealen Beziehung nach van't Hoff zunehmend größer und der sterische Exklusionseffekt gewinnt an Bedeutung. Besitzt eine polydisperse Lösung Anteile sehr hohen Molekulargewichts, führen schon geringe Konzentrationsänderungen zu bedeutenden Änderungen des KOD.
- VII. Reproduzierbare Messungen des KOD biologischer Flüssigkeiten (Serum, Lymphe) sind jeder Berechnungsformel überlegen. Eine Permeation von Makromolekülen im Größenbereich der Selektivität der Membran muß dabei ausgeschlossen werden können.

- VIII. Der Übergang einer hochmolekularen Lösung in den Gelzustand ist mit keiner Veränderung des KOD verbunden. Durch Dehydratation und Rehydratation eines Agar-Gels im Osmometer konnte der sogenannte Quellschwellungsdruck gemessen werden, der sich vom Dehydrationszustand, der Gelkonzentration und der Konzentration einer umgebenden Albuminlösung abhängig zeigte.
- IX. KOD-Messungen von Serum und Lymphe von Hunden bei akuter extremer Hämodilution durch isovolämischen Blutersatz mit Dextran 60- und Gelatine-Lösungen ergaben:
1. Akute Veränderungen im KOD von Plasma und Lymphe und des Lymphflusses sind vom KOD und der Dispersität der verwendeten Hämodilutionslösung abhängig.
 2. Die beobachteten Veränderungen lassen sich mit den bisher bekannten Vorstellungen über Kompensationsmechanismen des transkapillären Flüssigkeitsaustausches bei intravasalen KOD-Änderungen im Organismus nicht vollständig erklären.
- X. Aus den Ergebnissen der physikalisch-chemischen und physiologischen Untersuchungen läßt sich die Hypothese eines variabel dehydrierten interstitiellen Gels erstellen. Diese Hypothese kann einige der widersprüchlichen Aspekte der verschiedenen in der Literatur diskutierten Vorstellungen über Kompensationsmechanismen intravasaler KOD-Änderungen erklären.

G. FORMELBEZEICHNUNGEN

$A_0 \dots A_n$	: Virialkoeffizienten eines Polynoms
c, C	: Konzentration einer Lösung $\left[\frac{\text{mol}}{l}\right]$ oder $\left[\frac{g}{l}\right]$ oder $[g\%]$
d	: Dicke einer Membran $[cm]$
F	: Fläche einer Membran $[cm^2]$
FM	: Nettoflüssigkeitsaustausch von einer Kapillare in das Interstitium $\left[\frac{cm^3}{min \cdot cm^2 \cdot cmH_2O}\right]$
F_P	: Gesamtfläche von Membranporen $[cm^2]$
g	: Fallbeschleunigung $9,81 \left[\frac{cm}{s^2}\right]$
K_D	: Durchlässigkeit einer Membran für ein bestimmtes Solvens $\left[\frac{cm}{s}\right]$
K_H	: Hydraulische Leitfähigkeit einer Membran für ein bestimmtes Solvens $\left[\frac{cm^3}{min \cdot cm^2 \cdot cmH_2O}\right]$
K_P	: Permeabilitätskoeffizient einer Membran für ein bestimmtes Solvens $\left[\frac{1}{s}\right]$
K_S	: Strömungskonstante (Darcy-Koeffizient) einer Membran für ein bestimmtes Solvens $[cm^2]$
MG	: Molekulargewicht eines Soluts $\left[\frac{g}{mol}\right]$
P	: Hydrostatischer Druck $\left[\frac{p}{cm^2}\right]$ oder $[cmH_2O]$
P_c	: intrakapillärer hydrostatischer Druck $[cmH_2O]$
P_t	: interstitieller Druck $[cmH_2O]$
R	: Allgemeine Gaskonstante $8,314 \left[\frac{\text{Joule}}{mol \cdot grd}\right]$ oder $84,75 \cdot 10^3 \left[\frac{cm \cdot p}{mol \cdot grd}\right]$

r	: fiktiver Porenradius einer Membran [cm]
S	: Selektivitätskoeffizient einer Membran [-]
T	: Absolute Temperatur [Kelvin]
t	: Zeiteinheit [s] , [min]
η	: Dynamische Viskosität eines Solvens [cP]
π	: Kolloidosmotischer Druck [cmH ₂ O] oder [mmHg]
π_P	: KOD des Blutplasmas
π_t	: KOD der interstitiellen Flüssigkeit
ρ	: Dichte eines Solvens [$\frac{g}{cm^3}$]
σ	: Stavermann'scher Reflektionskoeffizient einer Membran für ein bestimmtes Solut [-]

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALLEN, P.W. and M.A. PLACE Solute diffusion in osmometry
J. Polym. Sci. 26, 386 (1957)
2. ALVANG, F. and O. SAMUELSON A comparison of different membranes
for osmotic determination of the molecular weight of nitrocellulose
J. Polym. Sci. 24, 353 (1957)
3. AREEKUL, S. Dynamics of transcapillary fluid
exchange in the isolated rabbit ear
Acta Soc. Med. Upsal. 74, 118 (1969)
4. ARMSTRONG, S.H. Jr., M. KARK, J.A. SCHOENBERGER, J. SHATKIN and R. SIGHTS Colloid osmotic pressures of serum
proteins in nephrosis and cirrhosis:
Relations to electrophoretic distributions and average molecular weights
J. clin. Invest. 33, 297 (1954)
5. ARTURSON, G. Glomerular permeability to dextrans
In: Capillary Permeability, Proc. A. Benzon Symp. II, p. 520 (1970)
(Crone and Lassen, Scand. Univ. Books, Munksgaard, Copenhagen 1970)
6. ARTURSON, G., T. GROTH and G. GROTHE Human glomerular membrane porosity
and filtration pressure: Dextran clearance data analysed by theoretical models
Clin. Sic. 40, 137 (1971)
7. AUTIO, L. V.J. KÄRKKÄINEN und V. WARTIOVAARA Über den Zusammenhang zwischen
Bluteiweißkörper und kolloidosmotischem Druck
Am. Med. exp. et biol. Fenn 409 (1957)

8. BJERRUM, N. und E. MANEGOLD
Über Kolloidummembranen: Darstellung gleichmäßiger Membranen und ihre Charakterisierung
Kolloid Z. 42, 97 (1927)
9. BJORNEBOE, M. and K. BIRGER JENSEN
Plasma volume, colloid-osmotic pressure and gamma globulin in multiple myeloma
Acta med. scand. 186, 475 (1969)
10. BREITENBACH, J.M. und E.L. FORSTER
Ein einfaches Osmometer
Österr. Chem. Z. 54, 346 (1953)
11. BRUNS, R.R. and G.E. PALADE
Studies on Blood Capillaries
I. General organisation of blood capillaries in muscle
J. Cell. Biol. 37, 244 (1968)
12. BRUNS, R.R. and G.E. PALADE
Studies on Blood Capillaries
II. Transport of ferritin molecules across the wall of muscle capillaries
J. Cell. Biol. 37, 277 (1968)
13. BURGÉN, A.S.V. and W.H. FRANCOMBE
The role of plasma colloid osmotic pressure in the regulation of extracellular fluid
Proc. Intern. Union of Physiol. Sci., 2, 130 (1962)
XXII. Internat. Cong. Leiden
14. CASLEY-SMITH, J.R.
The dimensions and numbers of small vesicles in cells, endothelial and mesothelial and the significance of these for endothelial permeability
J. Microscopy 90, 251 (1969)

15. CLEMENTIS, F. and G.E. PALADE
Interstitial Capillaries
I. Permeability to peroxidase and ferritin
J. Cell. Biol. 41, 33 (1969)
16. CRONE, C.
The permeability of capillaries in various organs, as determined by use of the 'Indicator Diffusion' Method
Acta physiol. scand. 58, 292 (1963)
17. DERGE, K.
Membran-Osmometer
"G-I-T" Fachztschr. Lab. 12, 1097
(Hoppenstedt Wirtschaftsverlag, Darmstadt, 1966)
18. DIALER, K. and H.G. ELIAS
Error in osmometry
J. Polym. Sci. 18, 424 (1955)
19. DICK, D.A.T.
Osmotic porperties of living cells
Int. Rev. Cytol. 8, 387 (1959)
20. DURBIN, R.P.
Osmotic flow of water across permeable cellulose membranes
J. gen. Physiol. 44, 315 (1960)
21. ELIAS, H.G. und T.A. RITSCHER
Ein einfaches 2-Kammer-Glasosmometer mit Glasmembran
J. Polym. Sci. 28, 648 (1958)
22. ELIAS, H.G.
T. RITSCHER und F. PATAT
Das Problem der Membran bei osmotischen Messungen an Hochpolymeren II
Makromol. Chem. 27, 1 (1958)
23. ENGLISH, T.A.H.
S. DIGERNESS and J.W. KIRKLIN
Changes in colloid osmotic pressure during and shortly after open intracardiac operation
J. thor. cardiovasc. Surg. 61, 338 (1971)

24. FIELD, M.E.,
O.C. LEIGH, Jr.,
J.W. HEIM and
C.K. DRINKER The protein content and osmotic pressure of blood serum and lymph from various sources in the dog
Am. J. Physiol. 110, 174 (1934)

25. FLORY, P.J. Statistical thermodynamics of polymer solutions
In: Flory, P.J.: Principles of polymer chemistry, 495
(Cornell University Press, Ithaca and London, 1971)

26. GARBY, L. and
S. AREEKUL A method for estimation of the "leak" to "pore" number ratio in capillary membranes
In: Capillary Permeability, Proc. A. Benzon Symp. II, p. 306
(Crone and Lassen, Scand. Univ. Books, Munksgaard, Copenhagen 1970)

27. GARBY, L. and
S. AREEKUL Reflection coefficients of neutral and sulfate-substituted dextran molecules in the capillaries of the isolated rabbit ear
In: Capillary Permeability, Proc. A. Benzon Symp. II, p. 560
(Crone and Lassen, Scand. Univ. Books, Munksgaard, Copenhagen 1970)

28. GARLICK, D.G. and
E.M. RENKIN Transport of large molecules from plasma to interstitial fluid and lymph in dogs
Am. J. Physiol. 219, 1595 (1970)

29. GAUER, O.H.,
J.P. HENRY and
C. BEHM The regulation of extracellular fluid
Annu. Rev. Physiol. 33, 547 (1970)

30. GIBSON, H. and K.A. GAAR Dynamics of the implanted capsule
Fed. Proc. 29, 319 Abs (1970)
31. GITHIN, D. and C.A. JANEWAY The dynamic equilibrium between
circulating and extravascular
plasma proteins
Science 118, 301 (1953)
32. GONZALEZ-FERNAN- Maximal substrate transport in
DEZ, J.M. and
S.E. ATTA capillary networks
Microvasc. Res. 5, 180 (1973)
33. GRAHAM, Th. Anwendung der Diffusion der Flüssig-
keiten zur Analyse
Liebigs Ann. 121, 1 (1862)
34. GRANATH, K. und Physikalisch-chemische Daten über
R. STRÖMBERG einige in der Infusionstherapie ver-
wendete Polymere
Anaesthesist 17, 224 (1968)
35. GROTTÉ, G. Passage of dextran molecules across
blood-lymph barrier
Acta chir. cand., Suppl. 211, 1 (1956)
36. GUYTON, A.C. and Effect of elevated left arterial pres-
A.W. LINDSEY sure and decreased plasma protein
concentration on the development of
pulmonary edema
Circ. Res. 7, 649 (1959)
37. GUYTON, A.C. Concept of negative interstitial pres-
sures in implanted perforated capsules
38. GUYTON, A.C. and Regulation of interstitial fluid volume
T.G. COLEMAN and pressure
Ann. N.Y. Acad. Sci. 150, 537 (1968)

39. GUYTON, A.C.,
H.J. GRANGER and
A.E.TAYLOR Interstitial fluid pressure
Physiol. Rev. 51, 527 (1971)
40. HANSEN, A.T. A new method for measuring colloid
osmotic pressure
Am. J. Physiol. 163, 720 (1950)
41. HANSEN, A.T. A new device for measuring colloid
osmotic pressure
Acta med. scand. 142, 266 (1952)
42. HANSEN, A.T. Osmotic pressure effect of the red
blood cells - possible physiological
significance
Nature 190, 504 (1961)
43. HANSEN, A.T. A self-recording electronic osmo-
meter for quick, direct measurement
of colloid osmotic pressure in small
samples
Acta physiol. scand. 53, 197 (1961)
44. HARGENS, A. R. and
P.F. SCHOLANDER Stretch mounting for osmotic mem-
branes
Microvasc. Res. 1, 417 (1969)
45. HAUCK, G. Physiological and pathophysiological
aspects of the venous microvascula-
ture
Basic Res. Cardiol. 68, 443 (1973)
46. HELLFRITZ, H. Über ein neues, schnell messendes
Osmometer
Makromol. Chem. 7, 184 (1951)
47. HELLFRITZ, H. und
H. KRÄMER Untersuchung makromolekularer Sub-
stanzen durch osmotische Messungen
1. Mitteilung
Kunststoffe 46, 450 (1956)

48. HELLFRITZ, H.
H. KRÄMER und
W. SCHMIEDER
Untersuchung makromolekularer Sub-
stanzen durch osmotische Messungen
2. Mitteilung
Kunststoffe 49, 391 (1959)
49. HEPP, O.
Ein neues Onkometer zur Bestimmung
des kolloidosmotischen Druckes mit
gesteigerter Meßgenauigkeit und ver-
einfachter Handhabung
Ztschr. ges. exp. Med. 99, 709 (1936)
50. HILL, R. M.
The determination of colloid osmotic
pressure in small quantities of fluid
J. Biol. Chem. 99, 323 (1933)
51. HOFFMANN, M. und
M. UNBEHEND
Neue Anwendungsmöglichkeiten der
Osmometrie
Makromol. Chem. 88, 256 (1965)
52. HOFFMANN, M.
Statistische Thermodynamik von Lö-
sungen unter Berücksichtigung der
Verhakung von Makromolekülen
Makromol. Chem. 174, 167 (1973)
53. IMMERGUT, E. H.,
S. ROLLIN, A. SAL-
KIND and H. MARK
New types of membranes for osmotic
pressure measurements
J. Polym. Sci. 12, 439 (1954)
54. INGERSLEV, P.,
O. A. LARSEN and
N. A. LASSEN
Measurement of the colloid osmotic
pressure in serum with Tybjaerg
Hansen's Osmometer
Scand. J. clin. Lab. Invest. 18, 431
(1966)
55. INTAGLIETTA, M.
and B. W. ZWEIFACH
Measurement of blood plasma colloid
osmotic pressure
I. Technical Aspects
Microvasc. Res. 3, 72 (1971)

56. JESCH, F. Der hämorrhagische Schock beim Hund und seine Beeinflußbarkeit durch hyperosmolare Lösungen
Dissertationsarbeit,
Universität München 1971
57. JOHNSON, J. A. Capillary permeability, extracellular space estimation, and lymph flow
Am. J. Physiol. 211, 1261 (1966)
58. KARNOVSKY, M. J. The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer
J. Cell. Biol. 35, 213 (1967)
59. KARNOVSKY, M. J. The ultrastructural basis of trans-capillary exchanges
J. gen. Physiol. 52, 64s (1968)
- 60a. KARNOVSKY, J. J. Morphology of capillaries with special reference to muscle capillaries
In: Capillary Permeability, Proc. A. Benzon Symp. II, p. 341 (1970)
(Crone and Lassen, Scand. Univ. Books, Munksgaard, Copenhagen 1970)
- 60b. KATCHALSKY, A. Polyelectrolyte gels
In: Progress in biophysics and biophysical chemistry, Vol. 4, p. 1
(J. A. V. Butler and J. T. Randall, ed. London: Pergamon Press 1954)
61. KIRSCH, K.,
W. RAFFLENBEUL
und H. ROEDEL Untersuchungen zur Ursache des negativen interstitiellen Gewebsdruckes
Pflügers Arch. ges. Physiol. 328,
193 (1971)

62. KROGH, A. und F. NAKAZAWA
Beiträge zur Messung des kolloid-osmotischen Druckes in biologischen Flüssigkeiten
Biochem. Z. 188, 241 (1927)
63. KROGH, A., E.M. LANDIS and A.H. TURNER
The movement of fluid through the human capillary wall in relation to venous pressure and to the colloid osmotic pressure of the blood
J. clin. Invest. 11, 63 (1932)
64. KUPKE, D.W.
Osmotic pressure
Adv. Protein Chem. 15, 57 (1960)
65. LADEGAARD-PEDERSEN, H.J.
Measurement of the colloid osmotic pressure in patients
Scand. J. clin. Lab. Invest. 20, 79 (1967)
66. LADEGAARD-PEDERSEN, H.J.
The colloid osmotic pressure in non-operated surgical patients
Acta Chir. Scand. 139, 135 (1973)
67. LADEGAARD-PEDERSEN, H.J.
Measurement of the interstitial pressure in subcutaneous tissue in dogs
Circulat. Res. 26, 765 (1970)
68. LANDIS, E.M.
The relation between capillary blood pressure and the rate of passage of liquid through the walls of single capillaries
Am. J. Physiol. 81, 492 (1927)
69. LANDIS, E.M.
Micro-injection studies of capillary permeability
II. The relation between capillary pressure and the rate at which fluid passes through the walls of single capillaries
Am. J. Physiol. 81, 492 (1927)

70. LANDIS, E.M. and J.G. GIBBON Jr. The effects of temperature and of tissue pressure on the movement of fluid through the human capillary wall J. Clin. Invest. 12, 105 (1933)
71. LANDIS, E.M. and J.R. PAPPENHEIMER Exchange of substances through the capillary walls
In: Hamilton W.F. and P. Dow: Handbook of Physiology, Sec. 2, Circulation 3, p. 961 (Am. Physiol. Soc., Washington D. C. 1963)
72. LAURENT, T.C. and A.G. OGSTON The interaction between polysaccharides and other macromolecules
4. The osmotic pressure of mixtures of serum albumin and hyaluronic acid Biochem. J. 89, 249 (1963)
73. LAURENT, T.C. The interaction between polysaccharides and other macromolecules
5. The solubility of proteins in the presence of dextran
Biochem. J. 89, 253 (1963)
74. LAURENT, T.C. Solubility of proteins in the presence of polysaccharides
Fed. Proc. 25, 1127 (1966)
75. LAURENT, T.C. The structure and function of the intercellular polysaccharides in connective Tissue
In: Capillary Permeability, Proc. A. Benzon Symp. II, p. 261 (Crone and Lassen, Scand. Univ. Books, Munksgaard, Copenhagen 1970)
76. LAURENT, T.C. In vitro studies on the transport of macromolecules through the connective tissue
Fed. proc. 25, 1128 (1966)

77. LAZARUS-BAR-LOW, W.S. Observations upon the initial rates of osmosis of certain substances in water and in fluid containing albumen J. of Physiol. 19, 140 (1896)
78. LEE, W.H.,
D. KRUMHAAR,
E.W. PONKALSRUD,
O.A. SHJEIDE and
J.V. MALONEY Denaturation of plasma proteins as a cause of morbidity and death after intracardiac operation Surgery 50, 29 (1961)
79. LIPPERT, W. Struktur von Membranfiltern
In: SM 12, Ein Handbuch der Sartorius Membranfilter GmbH, 3 (Göttingen 1969)
80. LÖNSMANN
POULSEN, H. Subcutaneous interstitial fluid albumin concentration in long-term diabetes mellitus
Scand. J. clin. Lab. Invest. 32, 167 (1973)
81. LOSOWSKI, M.S.,
E.M. ALLTREE and
M. ATKINSON Plasma colloid osmotic pressure and its relation to protein fractions
Clin. Sci. 22, 249 (1962)
82. LUFT, J.H. Fine structure of capillary and endo-capillary layer as revealed by ruthenium red
Fed. Proc. 25, 1173 (1966)
83. MAJNE, G. Ultrastructure of the vascular membrane
In: Hamilton W.F. and P. Dow: Handbook of Physiology sec. 2, vol. 3: 2293 (Am. Physiol. Soc., Washington D.C. 1965)

84. MARTY, A.T. and M. INTAGLIETTA Effect of anticoagulants on human plasma colloid osmotic pressure measurements
J. Appl. Physiol. 29 (5), 740 (1970)
85. MATHEWS, M.B. The interactions of proteoglycans and collagen-model systems
In: Balazs, E.A.: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix, 1155
(Academic Press, London/New York 1970)
86. MAYERSON, H.S., C.G. WELFRAM, H.H. SHIRLEY Jr. and K. WASSERMANN Regional differences in capillary permeability
Am. J. Physiol. 198, 155 (1960)
87. MAYERSON, H.S. The physiologic importance of lymph
In: Hamilton W.F. and P. Dow: Handbook of Physiology, sec. 21 Circulation 31, p. 1035
(Am. Physiol. Soc., Washington D.C. 1963)
88. MEEHAN, J.P., C.C. HYMAN and M. SOSNOW Measurement of colloid osmotic pressures with an unbounded strain gauge transducer
Statham Lab. Instr. Notes 1950
(Statham Lab., Hatorey: Puerto Rico)
89. MESSMER, K., L. SUNDER-PLASSMANN, W.P. KLÖVEKORN and K. HOLPER Circulatory significance of hemodilution:
Rheological changes and limitations
Adv. Microcirc. 4, 1 (1972)
(Karger, Basel/New York 1971)

90. MEYER, F. A.,
W. D. COMPER and
B. N. PRESTON
Model connective tissue systems.
A physical study of gelatin gels containing proteoglycans
Biopolymers 10, 1351 (1971)
91. MEYER, P.
Der kolloidosmotische Druck biologischer Flüssigkeiten
Ergebn. Physiol. 34, 18 (1932)
92. MEYERHOFF, G.
Zur Charakterisierung semipermeabler Membranen für osmotische Zwecke (1. Mitteilung über semipermeable Membranen)
Z. Elektrochem. 61, 325 (1957)
93. MOGENSEN, C. E.
The permeability of the glomerular capillaries as studied by renal dextran clearance in normal and diabetic subjects
In: Capillary Permeability, Proc. A. Benzon Symp. II, p. 531
(Crone and Lassen, Scand. Univ. Books, Munksgaard, Copenhagen 1970)
94. OGSTON, A. G.
On water binding
Fed. Proc. 25, 986 (1966)
95. OGSTON, A. G.
When is pressure osmotic?
Fed. Proc. 25, 1112 (1966)
96. OGSTON, A. G.
Measurement of osmotic properties of hyaluronic acid by equilibrium sedimentation
Fed. Proc. 25, 1118 (1966)
97. OSS, C. J. van,
C. R. McCONNELL,
R. K. TOMPKINS and
P. M. BRONSON
A membrane for the rapid concentration of dilute protein samples in an ultrafilter
Clin. Chem. 15, 699 (1969)

98. OSS, C.J. van and P.M. BRONSON Characteristic of a protein concentrating anisotropic cellulose membrane Separation Sci. 5, 63 (1970)
99. OTT, H. Die Errechnung des kolloidosmotischen Serumdruckes aus dem Spektrum und das mittlere Molekulargewicht der Serumeiweißfraktionen Klin. Wschr. 34, 1079 (1956)
100. PALADE, G.E. and R.R. BRUNS Structural modulations of plasmalemmal vesicles J. Cell Biol. 37, 633 (1968)
101. PALS, D.T. F. and A.J. STAUERMAN An osmometer with an ideal semipermeable boundary J. Polym. Sci. 23, 69 (1957)
102. PAPPENHEIMER, J.R. and A. SOTO-RIVERA Effective osmotic pressure of the plasma proteins and other quantities associated with the capillary circulation in the hindlimbs of cats and dogs Am. J. Physiol. 152, 471 (1948)
103. PAPPENHEIMER, J.R., E.M. RENKIN and L.M. BORRERO Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes
A contribution to the pore theory of capillary permeability
Physiol. Rev. 33, 13 (1953)
104. PAPPENHEIMER, J.R. Passage of molecules through capillary walls
Physiol. Rev. 33, 387 (1953)
105. PAPPENHEIMER, J.R. and E.C. LIN The rapid measurement and recording of osmotic pressure
Science 118, 574 (1953)

106. PATAT, F. Das Problem der Membran bei osmotischen Messungen an Hochpolymeren
Z. Elektrochem. 60, 208 (1956)
107. PRESTON, B. N., The composition and physicochemical properties of hyaluronic acids prepared from ox synovial fluid and from a case of mesothelioma
M. DAVIES and
A. G. OGSTON
Biochem. J. 96, 449 (1965)
108. PREUSSER, H. J. Die Ultrastruktur einiger feinporiger Membranfiltertypen.
II. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Querschnitten
Kolloid-Z. u. Z. Polymere 250, 579 (1972)
109. REESE, T. S. and Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase
M. J. KARNOVSKY
J. Cell. Biol. 34, 202 (1967)
110. RENKIN, E. M. Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes
J. gen. Physiol. 38, 225 (1954)
111. RENKIN, E. M. und Wasserdurchlässigkeit und Permeabilität der Capillarwände
J. R. PAPPENHEIMER
Ergeb. Physiol. 49, 59 (1957)
112. RENKIN, E. M. Transcapillary exchange in relation to capillary circulation
J. gen. Physiol. 52, 96s (1968)

113. RENKIN, E. M. Permeability and molecular size in peripheral and glomerular capillaries
In: Capillary Permeability, Proc. A. Benzon Symp. II, p. 544
(Crone and Lassen, Scand. Univ. Books, Munksgaard, Copenhagen 1970)
114. RENKIN, E. M. and D. G. GARLICK Transcapillary exchange of large molecules between plasma and lymph
In: Capillary Permeability, Proc. A. Benzon Symp. II, p. 553
(Crone and Lassen, Scand. Univ. Books, Munksgaard, Copenhagen 1970)
115. RENKIN, E. M. and D. G. GARLICK Blood-lymph transport of macromolecules
Microvasc. Res. 2, 392 (1970)
116. RITSCHER, T. A. und H. G. ELIAS Das Problem der Membran bei osmotischen Messungen an Hochpolymeren III
Makromol. Chem. 27, 48 (1958)
117. ROWE, D. S. An electronic colloid osmometer
J. Physiol. 123, 18 (1954)
118. SCATCHARD, G., A. C. BATCHELDER and A. BROWN Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation
VI. The osmotic pressure of plasma and of serum albumin
J. clin. Invest. 23, 458 (1944)

119. SCATCHARD, G.,
A.C. BATCHELDER
and A. BROWN Preparation and properties of serum
and plasma proteins
VI. Osmotic equilibria in solutions of
serum albumin and sodium chloride
J. Am. Chem. Soc. 68, 2320 (1946)

120. SCHADE, H. und
F. CLAUSSEN Der onkotische Druck des Blutplas-
mas und die Entstehung der renal
bedingten Ödeme
Z. klin. Med. 100, 365 (1924)

121. SCHADE, H. Modellstudien über den Flüssigkeits-
austausch an den Kapillaren
Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 36, 54
(1924)

122. SCHOLANDER, P.F.,
A.R. HARGENS and
S.L. MILLER Negative pressure in the interstitial
fluid of animals
Science 161, 321 (1968)

123. SCHOLANDER, P.F. State of water in osmotic processes
Microvasc. Res. 3, 215 (1971)

124. SCHULZ, G.V. Osmotischer Druck
In: Stuart H.A., Physik der Hoch-
polymeren, Bd. 2, p. 373 (Springer
Berlin 1953)

125. SCHULZ, G.V. und
W.H. KUHN Zur Kinetik des Einstellvorganges
im Osmometer
Makromol. Chem. 29, 220 (1959)

126. SHEA, S.M. and
M.J. KARNOVSKY Brownian Motion: A theoretical ex-
planation for the movement of vesicles
across the endothelium
Nature 212, 353 (1966)

127. SHEA, S. M.,
M. J. KARNOVSKY
and W. H. BOSSERT Vesicular transport across endothelium: simulation of a diffusion model
J. theor. Biol. 24, 30 (1969)
128. SOERENSEN, S. P. L. Studies on proteins
C. r. Labor Carlsberg 12, 262 (1917)
129. STARLING, E. H. On the absorption of fluids from the connective tissue spaces
J. of Physiol. 19, 312 (1896)
130. STARLING, E. H. The glomerular functions of the kidney
J. of Physiol. 19, 317 (1896)
131. STAUFF, J. Physikalisch-chemische Eigenschaften der Gele unter Bewahrung ihrer Struktur
In: Stauff, J.: *Kolloidchemie*, 685
(Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/Göttingen 1960)
132. STAVERMANN, A. J. Apparent osmotic pressure of solutions of heterodisperse polymers
Rec. trav. chim. 71, 623 (1952)
133. STAVERMANN, A. J.,
D. T. F. PALS and
Ch. A. KRUSSINK Osmometry with membranes permeable to solute
J. Polym. Sci. 23, 57 (1957)
134. STOLL, H. R. and
H. S. NITSCHMANN Comparative physicochemical studies of plasma substitutes
In: *Modified gelatins as plasma substitutes*
Bibl. haemat. 33, 96
(Karger, Basel/New York 1969)

135. STROMBERG, D.D. and C.A. WIEDERHIELM Effects of oncotic gradients and enzymes on negative pressures in implanted capsules
Am. J. Physiol. 219, 928 (1970)
136. STROMME, S.B., J.E. MAGGERT and P.F. SCHOLANDER Interstitial fluid pressure in terrestrial and semiterrestrial animals
J. Appl. Physiol. 27, 123 (1969)
137. TAMMAN, G. Zur Messung osmotischer Drucke
Z. phys. Chem. 9, 97 (1892)
138. TOMLIN, S.G. Vesicular transport across endothelial cells
Biochim. Biophys. Acta 183, 559 (1969)
139. van't HOFF, J.H. Die Rolle des osmotischen Druckes in der Analogie zwischen Lösungen und Gasen
Z. phys. Chem. 1, 481 (1887)
140. WAKE, J.R.H. and A.M. Posner Membranes for measuring low molecular weights by osmotic pressure
Nature 213, 692 (1967)
141. WASSERMANN, K. and H.S. MAYERSON Exchange of albumin between plasma lymph
Am. J. Physiol. 165, 15 (1951)
142. WELLS, H.S., J.B. YOUMANS and D.G. MILLER, Jr. A formula and nomogram for the estimation of the osmotic pressure of colloids from the albumin and total protein concentrations of human blood sera
J. clin. Invest. 12, 1103 (1933)
143. WETZEL, M.G., B.K. WETZEL and S.S. SPICER Ultrastructural localization of acid mucosubstances in the mouse colon with iron-containing stains
J. Cell Biol. 30, 299 (1966)

144. WIEDERHIELM, C. A. and R. F. RUSHMER Pre- and post-arteriolar resistance changes in the blood vessels of the frog's mesentery
Bibl. anat. 4, 234
(Karger, Basel/New York 1964)
145. WIEDERHIELM, C. A. Dynamics of transcapillary fluid exchange
J. gen. Physiol. 52, 29s (1968)
146. WIEDERHIELM, C. A. Microvascular, lymphatic, and interstitial pressures in the bat wing
Proc. Intern. Union Physiol. Sci. 7, 468 (1968)
147. WIEDERHIELM, C. A., D. D. STROMBERG and D. R. LEE Oncotic pressure in minute fluid samples and tissues
Fed. Proc. 29, 319 Abs (1970)
148. WIES, C. H. and J. P. PETERS The osmotic pressure of proteins in whole serum
J. clin. Invest. 16, 93 (1937)
149. WINNE, D. Die Kapillarpermeabilität hochmolekularer Substanzen
Pflügers Arch. ges. Physiol. 283, 119 (1965)
150. YOULTEN, L. J. F. The permeability of human serum albumin (HSA) and polyvinylpyrrolidone (PVP) of skeletal muscle (rat cremaster) blood vessel walls
J. Physiol. 204, 112P (1969)
151. ZWEIFACH, B. W. and M. INTAGLIETTA Measurement of blood plasma colloid osmotic pressure
II. Comparative study of different species
Microvasc. Res. 3, 83 (1971)

Herrn Prof. Dr. W. Kliner danke ich für die freundliche Überlassung des Arbeitsplatzes an der Abteilung für Herzchirurgie an der Universität München.

Bei Herrn Prof. Dr. F. Sebening bedanke ich mich für die wohlwollende Unterstützung und sein reges Interesse bei der Bearbeitung dieses Themas.

Herrn Dr. N. Mendler danke ich für die Einführung in die Methodik experimenteller Arbeit und seine konstruktive Kritik.

Für die Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen dieser Arbeit danke ich Frau E. Denkert und Frl. Ch. Schülgen.

LEBENS LAUF

Am 2. September 1946 wurde ich in Mühldorf/Inn als einziger Sohn des Bundesbahnbeamten Franz Xaver Schröck und seiner Frau Katharina, geb. Betz geboren.

Nach dem Umzug nach München-Pasing besuchte ich ab 1953 die dortige Volksschule und anschließend die Oberrealschule München-Pasing (heute Max-Planck-Gymnasium), wo ich 1966 die Reifeprüfung ablegte. Im gleichen Jahr begann ich an der Universität München das vorklinische Medizinstudium, wechselte zum klinischen Studium zur medizinischen Fakultät der Technischen Universität München über und schloß dort 1972 mit dem medizinischen Staatsexamen ab.

Im Oktober 1972 verehelichte ich mich mit der deutschamerikanischen Sozialarbeiterin Sigrid Veit.

Als Medizinalassistent war ich vom 1. Febr. 1973 bis 28. Febr. 1974 an der Stiftsklinik Augustinum München, am Städt. Krankenhaus München-Harlaching und im Sonderforschungsbereich 37 der Universität München am Deutschen Herzzentrum tätig. Am 25. April 1974 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt. Zur Fortsetzung der experimentellen Arbeit bin ich weiterhin beim genannten Sonderforschungsbereich angestellt.



